

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

MARC BROSSEAU

B. Sc. (BIOCHIMIE)

ETUDE DE LA TOXICITE ET DU CONTENU EN TOXINES DE
CERTAINS CHAMPIGNONS DU QUEBEC DU GENRE *AMANITA*

A00T 1982

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

TABLE DES MATIERES

	Page
TABLE DES MATIERES	i
LISTE DES FIGURES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
REMERCIEMENTS	vi
RESUME	vii
Section	
I- INTRODUCTION	1
II- LITTERATURE	5
1- Enoncé du problème	5
2- Toxicité de l' <i>Amanita phalloïdes</i> et de ses toxines	8
2.1- L' <i>Amanita phalloïdes</i>	8
2.2- Les phallotoxines	9
2.3- Les amatoxines	15
3- Extraction des toxines de l' <i>Amanita phalloïdes</i>	17
4- Structure et toxicité des toxines	18
5- Protection de l'actine par la phalloïdine contre l'action protéolytique de la pronase	22
6- Objectifs	27
III- MATERIEL ET METHODES	28
1- Matériel	28
2- Méthodes	30
2.1- Récolte et identification des champignons	30
2.2- Extraction de toxines	31
2.3- Toxicité chez les souris	31
2.4- Détermination de la DL ₅₀ chez les souris	33
2.5- Dosage des toxines par Chromatographie en phase liquide	34
2.6- Dosage de l'activité de protection de l'actine F	34
2.6.1- Protection de l'actine suivie par fluorimétrie	34
2.6.2- Formule et méthode de dosage basées sur la fluorimétrie	35
2.6.3- Protection de l'actine suivie par viscosimétrie	39
2.7- Chromatographie sur colonne et spectroscopie UV	39

Section	Page
IV- RESULTATS	41
1- Espèces d'Amanites	41
2- Extraction des toxines d'Amanites	46
3- Toxicité des champignons sur les souris	48
4- Détermination de la DL_{50} de l'extrait no 1 d' <i>A. virosa</i>	50
5- Etude de toxines connues par chromatographie en phase liquide à haute pression	53
6- Etude par fluorimétrie de la protection de l'actine F par des extraits de champignons	57
7- Fluorescence de l' <i>A. citrina</i>	59
8- Etude par viscosimétrie de l' <i>A. citrina</i>	61
9- Méthode de dosage	63
10- Séparation par chromatographie sur colonne et spectre d'élution de l'extrait no 9 d' <i>A. virosa</i>	67
11- Séparation par chromatographie sur colonne et spectre d'élution de l'extrait no 18 d' <i>A. citrina</i>	71
12- Evaluation de l'activité des chapeaux et des pieds des extraits d' <i>A. virosa</i>	75
V- DISCUSSION	77
VI- CONCLUSION	87
BIBLIOGRAPHIE	89

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.	Structure cyclique des toxines de l' <i>Amanita phalloïdes</i> . Caractères différentiels entre les diverses toxines.	3
2.	Spectre d'absorption UV de l'actine et de la phalloïdine.	13
3.	Spectre différentiel de la combinaison de l'actine et de la phalloïdine.	14
4.	Changement de densité optique de l'actine dû à l'augmentation de la concentration de phalloïdine.	14
5.	Formule générale des phallotoxines avec divers groupements et positions.	19
6.	Effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par viscosimétrie.	23
7.	Spectre de fluorescence de l'actine F native et l'actine F dénaturée.	24
8.	Effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par fluorimétrie.	26
9.	Effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine G par la pronase, suivi par fluorimétrie.	26
10.	Représentation schématique de la méthode d'extraction des toxines.	32
11.	Formule de dosage des phallotoxines et de substances analogues ayant un effet protecteur sur l'actine F.	37
12.	Représentation de la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivie par fluorimétrie.	38
13.	Spectre d'élution de toxines séparées par chromatographie en phase liquide à haute pression.	55

Figure		Page
14.	Effet des extraits d'Amanites sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par fluorimétrie.	58
15.	Spectre d'émission et d'excitation de fluorescence de l'extrait no 18 d' <i>A. citrina</i> .	60
16.	Effet de l'extrait no 18 d' <i>A. citrina</i> sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par viscosimétrie.	62
17.	Effet des extraits no 1 et 3 d' <i>A. virosa</i> sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par fluorimétrie.	64
18.	Effet des extraits no 5, 7 et 9 d' <i>A. virosa</i> sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par fluorimétrie.	65
19.	Spectre d'élution de l'extrait no 9 d' <i>A. virosa</i> .	68
20.	Spectre d'élution des fractions A et B de l'extrait no 9 d' <i>A. virosa</i> .	69
21.	Spectre d'élution de l'extrait no 18 d' <i>A. citrina</i>	72
22.	Spectre de densité optique de la fraction A de l' <i>A. citrina</i> .	73
23.	Spectre de densité optique de la fraction B de l' <i>A. citrina</i> .	74
24.	Structure cyclique des virotoxines. Caractères différentiels entre les toxines.	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1. Viscosité spécifique de solutions d'actine G avec des cyclopeptides toxiques et non toxiques, avant et après l'addition de KI.	12
2. Structures et toxicité de différentes phallotoxines naturelles et chimiquement transformées.	21
3. Extraits d'Amanites.	47
4. Effet des extraits d'Amanites sur les souris blanches.	49
5. Effet toxique de différentes dilutions de l'extrait no 1 d' <i>A. virosa</i> sur les souris blanches.	51
6. Effet toxique de différentes dilutions de l'extrait no 1 d' <i>A. virosa</i> sur les souris blanches.	51
7. Effet toxique de différentes dilutions de l'extrait no 1 d' <i>A. virosa</i> sur les souris blanches, exprimé en pourcentage de mortalité.	51
8. Etude de toxines connues par chromatographie en phase liquide à haute pression.	54
9. Activité de cinq extraits d' <i>A. virosa</i>	66
10. Activité des cinq fractions de l'extrait no 9 d' <i>A. virosa</i> .	70
11. Activité de différentes parties de cinq champignons <i>A. virosa</i> .	76

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de cette étude.

Le Docteur Julian Gruda, directeur de ce projet, qui m'a apporté le support professionnel et financier.

Docteur René Pomerleau, pour son aide dans l'identification des champignons.

Madame Diane Bégin, pour son assistance technique en ce qui concerne la partie expérimentale de ce travail.

Et mon épouse, Lynda Morin, pour la présentation dactylographique de ce mémoire.

RESUME

On note dernièrement une croissance rapide au sein de la population du pays et, notamment au Québec, d'un intérêt pour la cueillette et la consommation de champignons sauvages. Ce phénomène marque l'importance d'une étude de la toxicité des champignons du genre *Amanita*. Les principaux objectifs de cette maîtrise étaient: 1- Vérifier la toxicité des différentes Amanites in vivo; 2- vérifier la méthode de dosage des phallotoxines et l'améliorer, si nécessaire; 3- vérifier le contenu en toxines qui agissent sur l'actine de façon semblable à la phalloïdine; 4- essayer de séparer la ou les substances toxiques.

La toxicité des extraits d'Amanites a été vérifiée pour des souris blanches par injection intrapéritonéale; la DL_{50} a été trouvée

pour le champignon le plus toxique. Nous avons ensuite déterminé l'activité toxique des Amanites par l'effet protecteur des phallotoxines pour l'actine F contre l'action protéolytique de la pronase. Cette activité est suivie par spectrofluorimétrie et par viscosimétrie. Cette technique a servi à l'amélioration de la méthode de dosage semi-quantitative de ces toxines. Les extraits de champignon qui ont montré un effet sur l'actine ont été séparés par chromatographie sur colonne. Nous avons vérifié s'il y avait une différence quantitative en toxines entre les différentes parties du champignon *A. virosa*.

La toxicité pour les souris a été étudiée à partir des huit espèces d'Amanites suivantes: *A. brunnescens*, *A. citrina*, *A. flavoconia*, *A. flavorubens*, *A. muscaria*, *A. rubescens*, *A. tomentella*, *A. virosa*. L'*A. muscaria*, l'*A. rubescens* et l'*A. virosa* se sont avérées mortelles pour les souris. L'*A. virosa* a donné une DL_{50} de 260 mg de champ. sec/kg de poids corporel de souris. Des huit espèces étudiées, seules l'*A. virosa* et l'*A. citrina*, ont montré un effet protecteur sur l'actine. Des virotoxines de l'*A. virosa* ont d'ailleurs démontré un effet sur l'actine semblable à celui de la phalloïdine. Les substances actives de l'*A. virosa* ont été séparées par chromatographie sur colonne. Nous avons trouvé que le chapeau de l'*A. virosa* contient environ deux fois plus de toxines que le pied.

Après toutes ces recherches, c'est surtout l'*A. citrina* qui re-

tient notre attention à cause de son action inattendue sur l'actine.
L'isolation de son (ses) principe(s) actif(s) serait fort intéressante.
Une méthode de dosage rapide et sélective de ces toxines serait à envisager, par exemple, par chromatographie en phase liquide à haute pression.

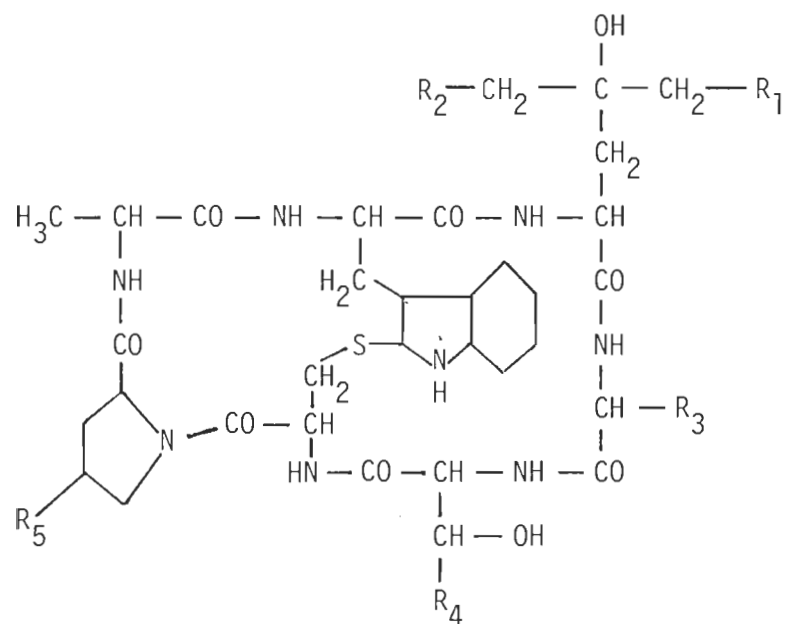
INTRODUCTION

Les intoxications fongiques ne datent pas d'aujourd'hui; les premières connues remontent à l'Antiquité (40). Chez les Anciens, les champignons étaient recherchés tant pour la succulence de leur chair que pour leurs effets aphrodisiaques. Si les intoxications ont été parfois de nature criminelle, par exemple l'assassinat de Claudius (40), la grande majorité de celles-ci ont été et restent de nature accidentelle; Claudius I^{er}, empereur romain, avait marié en secondes noces Agrippine-la-jeune, qui avait un fils nommé Néron; Claudius voulait que son fils de sang, Britannicus, lui succède sur le trône; mais Agrippine voulait que Néron soit l'empereur. Donc pour arriver à ses fins, elle empoisonna Claudius en ajoutant des *Amanita phalloïdes* dans son plat habituel de champignons. Le champignon qu'il consommait habituellement prit le nom *Amanita Caesarea*, du même genre que le précédent.

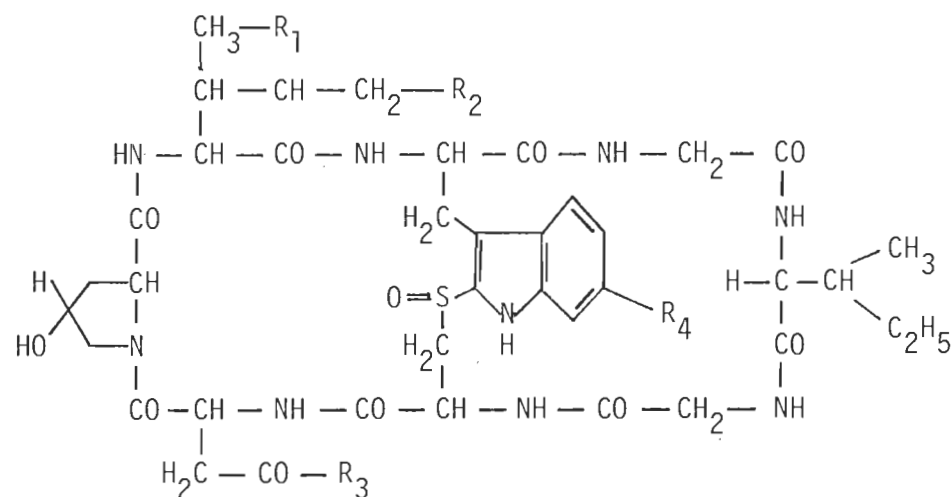
En France, au siècle dernier, on estimait à 300 (40) le total annuel des décès dûs aux Amanites mortelles. Au début du siècle, ce nombre a baissé à 100 et aujourd'hui, il se situe au-dessous de 30. Le nombre de décès a diminué considérablement grâce aux renseignements fournis principalement dans plusieurs musées de France. Aux Etats-Unis, toujours au début du siècle, on a dénombré plusieurs mortalités causées par ces champignons. Aujourd'hui, il est très difficile d'évaluer le nombre d'intoxications. Au Canada, nous ne connaissons aucune intoxication de ce genre. Cependant, on note dernièrement une croissance rapide dans la population du pays, et notamment au Québec, de l'intérêt pour la cueillette et la consommation des champignons sauvages. Ce phénomène, si non accompagné d'une bonne connaissance des champignons réellement toxiques, peut causer des intoxications.

Trois espèces d'Amanites sont bien connues pour leurs effets mortels, soit l'*Amanita phalloïdes*, l'*A. verna* et l'*A. virosa* (74). L'*A. phalloïdes* et l'*A. verna* peuvent contenir onze toxines différentes, divisées en deux groupes, les amatoxines et les phallotoxines (Fig. I). Ce sont des toxines bicycliques, différenciées par divers groupements R et par un acide aminé en plus pour les amatoxines. Cependant nous ne connaissons pas le contenu en toxines pour l'*A. virosa* qui contrairement aux deux autres espèces, est très fréquente au Québec (57).

PHALLOTOXINES



AMATOXINES



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
PHALLOIDINE	OH	H	CH ₃	CH ₃	OH
PHALLOINE	H	H	CH ₃	CH ₃	OH
PHALLISINE	OH	OH	CH ₃	CH ₃	OH
PHALLACIDINE	OH	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH
PHALLINE B	H	H	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	H

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
α AMANITINE	OH	OH	NH ₂	OH
β AMANITINE	OH	OH	OH	OH
γ AMANITINE	OH	H	NH ₂	OH
ε AMANITINE	OH	H	OH	OH
AMANINE	OH	OH	OH	H
AMANULLINE	H	H	NH ₂	OH

Figure 1 - Structure cyclique des toxines de l'*A. phalloides*. Caractères différentiels entre les diverses toxines, (d'après Thevenin *et al*, 1976)

L'*A. muscaria*, un autre champignon toxique mais non mortel, est très bien connu (40) pour ses effets aphrodisiaques, hallucinogènes et délirants, qui ont fait croire à son pouvoir divin ou démoniaque. Elle provoque aussi des symptômes d'une intoxication gastro-intestinale, rarement sérieuse. La muscarine, longtemps considérée comme la toxine responsable de ces troubles gastriques, ne serait pas en quantité suffisante pour provoquer ces effets. (68). On dénombre plusieurs autres espèces d'*Amanites* au Québec dont la toxicité n'est pas toujours certaine. Il serait donc intéressant de faire une première étude de ces champignons dans le but d'établir leur toxicité et leur contenu en toxines.

II

LITTERATURE

I- Enoncé du problème

Les champignons mortels du genre *Amanita*, famille des *Amanitaceae*, ordre des Basidiomycètes, font l'objet d'étude depuis plus d'un siècle. Le champignon *Amanita phalloïdes*, de même que ses extraits, ont retenu l'attention jusqu'à nos jours. C'est le groupe de recherche de Théodor Wieland de l'Institut Max Planck en Allemagne Fédérale qui a fait le plus de recherches dans ce domaine. Wieland et Wieland (1972) (74) ont isolé deux groupes de onze toxines (phallotoxines et amatoxines) du champignon *A. phalloïdes* provenant d'Europe (Fig. I). Ils sont d'ailleurs les seuls à avoir identifié leurs structures.

Faulstich et Cochet-Meilhac (1976) (13), du même centre de recherche, ont noté la présence d'amatoxines dans six espèces d'Amanites: l'*A. phalloïdes*, l'*A. virosa*, l'*A. citrina*, l'*A. muscaria*, l'*A. pantherina* et l'*A. rubescens*. Dans la littérature (74), seules l'*A. phalloïdes*, l'*A. verna* et l'*A. virosa* sont considérées comme mortelles, ce qui est sûrement dû à leur contenu élevé en amatoxines (13). Courtillot et Staron (1970) (6) de France parlent d'une nouvelle toxine, la virosine, qu'ils ont extrait de l'*A. virosa*. Ils n'ont toutefois pas élucidé sa structure. L'ouvrage s'oriente principalement sur la taxonomie.

Plus près de nous, dans le Maine aux Etats-Unis, Malak (1976) (50) a noté la présence de phallotoxines et d'amatoxines dans le champignon *A. virosa*. Selon Yocum et Simon (1977) (75), Malak parle aussi de la présence de phallotoxines dans le champignon comestible *A. rubescens*. Yocum et Simon (1977) (75) ont aussi étudié différentes espèces d'Amanites du nord-est des Etats-Unis. Ils ont noté eux aussi la présence de phallotoxines et d'amatoxines dans l'espèce *A. phalloïdes*. Il a été montré dans certains champignons d'espèce *A. virosa* la présence d'amatoxines seules, dans d'autres de phallotoxines seules et dans les autres des deux sortes de toxines. Pour leur part, ils n'ont pas retrouvé de phallotoxines dans l'espèce *A. rubescens*.

Au Canada, aucune étude de ce genre n'a été faite jusqu'à ce jour. La toxicité de ces champignons pourrait varier beaucoup d'un

continent ou d'un pays à l'autre, principalement à cause de la latitude et de la longitude, des constituants du sol, des conditions climatiques, etc. D'ailleurs à ma connaissance, on n'a toujours pas trouvé au Canada de champignon *A. phalloïdes*, très répandu en Europe. Par contre, le champignon *A. virosa* très fréquent par chez-nous, est très rare en Europe. L'objectif de ce travail a donc été de déterminer la toxicité des Amanites de la région de la Mauricie et d'identifier, si possible, leurs toxines éventuelles majeures. Nous nous sommes servis des toxines de l'*A. phalloïdes* comme point de référence et surtout de la phalloïdine, qui est la mieux connue et qui a déjà été utilisée pour des recherches dans notre laboratoire.

2- Toxicité de l'*A. phalloïdes* et de ses toxines

2.1- L'*A. phalloïdes*

Chez l'homme (74), 50 g de champignon frais d'*A. phalloïdes* lui sont mortels. Après une période de latence de 10 à 20 heures, l'intoxication se manifeste avec l'apparition de nausées, de vomissements et de diarrhées, ce qui entraîne rapidement un état de déshydratation intense et certains troubles électrolytiques (41). Après 24 heures, apparaissent des atteintes viscérales avec cytolysé hépatique. A ce moment, les transaminases glutamate-oxaloacétate et glutamate-pyruvate peuvent être très élevées. On remarque un gonflement du foie et aussi l'apparition d'ictère, d'hémorragies diffuses et massives par diminution de la synthèse hépatique de certains facteurs de coagulation tels que la prothrombine, la proaccélérine, la proconvertine, le facteur de Stuart, le facteur anti-hémophilique et le fibrinogène. Les autres viscères atteintes sont surtout le coeur, le système nerveux central et les reins. La mort intervient de 2 à 4 jours après l'ingestion du champignon (41,74). Les phallotoxines ne semblent pas jouer un rôle décisif dans cette mortalité qui reviendrait aux amatoxines (72).

Il n'existe aucun antidote, mais un ensemble complexe thérapeutique; on doit assurer la survie de l'individu au-delà de 10 jours et après ce délai, le danger semble écarté (41). Plusieurs substances ont été essayées sur des souris afin de neutraliser l'effet de ces

toxines: pénicilline (19,25,53), cytochrome C (20,22,44), silymarin (22, 23,44,66), phénylbutazone (19,34), rifampicin (19,21), épinéphrine (77), antanamide (anti-toxine naturelle du champignon)(18,23), etc.; on a même essayé la phalloïdine contre la phalloïdine (24) et aussi une hépatectomie partielle (26,64). Quelques-uns de ces produits se sont montrés efficaces s'ils étaient administrés une heure avant ou après l'intoxication. Mais après quelques heures, il n'y avait que très peu ou pas du tout de protection contre ces toxines.

2.2- Les phallotoxines

Une toxine appelée phalloïdine, extraite du champignon *A. phalloïdes* et injectée par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou encore sous-cutanée, entraîne la mort de 50 pour cent des souris blanches (DL_{50}) pour une dose de 2.5 mg/kg de poids corporel (74). La mort intervient de 2 à 5 heures après l'injection. Les autres phallotoxines de ce champignon ont montré une toxicité semblable pour des souris blanches. La phalloïdine produit in vivo un gonflement du foie de la souris, qui est relié à une accumulation excessive de sang dans le foie et à la formation de vacuoles non graisseuses (1,17,27,28,29) et on observe un relâchement d'enzymes lysosomiaux (30,39,59,76). Pour leur part, des hépatocytes isolés en présence de ces toxines développent des protubérances, mais il n'y a ni enflure, ni formation de vacuoles (17,28,29,46),

ni relâchement d'enzymes lysosomiaux (31).

D'une étude par microscopie électronique de fragments de membranes obtenus par centrifugation de gradient de foies de souris empoisonnées, on a régulièrement observé de nombreuses structures filamenteuses (2,32,65,67) de 60 \AA de large et de $1 \text{ }\mu\text{m}$ de long. Des structures analogues peuvent aussi être produites in vitro par incubation de phalloïdine avec des préparations de membranes cytoplasmiques de foies de souris non empoisonnées (35). En utilisant de la desméthylphalloïne marquée, il a été prouvé que la toxine était liée aux mêmes filaments (36, 73). A partir de méromyosine lourde, marqueur spécifique de l'actine, il a été démontré que les filaments étaient de l'actine F (37,45), un polymère de l'actine G.

Nous savons que l'actine joue un rôle essentiel dans le phénomène de la contraction autant dans les cellules musculaires que non musculaires (51,52). Cependant, les phallotoxines n'entraînent pas la mort des cellules musculaires comme c'est le cas pour les cellules hépatiques (74). Le fait que, in vivo, seules les cellules hépatiques soient affectées par la phalloïdine tandis que les muscles et d'autres tissus qui contiennent pourtant aussi de l'actine ne le soient pas, s'expliquerait par l'imperméabilité à cette substance des membranes des tissus autres qu'hépatiques (74). Il a été démontré qu'il existe des protéines à la surface des cellules du foie, indispensable à la pénétration de la phalloïdine (15,33,42,43).

In vitro, la phalloïdine provoque la polymérisation irréversible de l'actine G en filament d'actine F (II,I7,69). La polymérisation de l'actine G, pour se produire, a besoin de Mg^{++} ou de K^+Cl^- ou d'une force ionique élevée. Par ailleurs, la dépolymérisation de l'actine F intervient après une diminution de la force ionique ou par de hautes concentrations (0.6M) de KI ou de KSCN. Par viscosimétrie (49), il a été démontré que la phalloïdine induit la polymérisation de l'actine G, même en présence de faibles concentrations d'ions K^+ . La phalloïdine a pour effet d'accélérer la polymérisation de l'actine. Dans ces conditions, la polymérisation est produite autant par les dérivés toxiques que non toxiques de la phalloïdine (Tableau I); le plus remarquable dans ce tableau est que la viscosité est maintenue en présence de KI (7) seulement dans le cas des composés toxiques (69). La phalloïdine augmente aussi la résistance de l'actine contre la dégradation par certains enzymes comme la pronase (55) et la trypsine (55) ainsi qu'à la dégradation par la chaleur (9), les ultra-sons (69,70), la Cytochalasine B (48), et le pH acide (47,69).

La spectroscopie UV nous donne la preuve de l'interaction de la phalloïdine avec l'actine (71). La figure 2 montre le spectre de la phalloïdine et de l'actine et la figure 3, le spectre différentiel entre l'actine/phalloïdine et, l'actine plus la phalloïdine. Aux deux longueurs d'onde de 295 nm et 305 nm, le spectre UV est changé par l'interaction de la toxine avec l'actine. Dans des expériences de contrôle,

TABLEAU 1

Viscosité spécifique de solutions d'actine G (1.2mg/ml 1 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.7 mM Mg^{++}) avec des cyclopeptides toxiques et non-toxiques (80 μ g), avant et après l'addition de KI (0.6 M), (d'après Wieland, 1976)

Composé ajouté	η spéc. avant	Après l'ajout de KI
Aucun	0	-
KCl	1.04	0
Phalloïdine	1.04	0.93
Phalloacidine	1.0	0.70
Desméthylphalloïne	1.2	0.94
(R)Phalloïdine-sulfoxyde	1.1	0.94
(S)Phalloïdine-sulfoxyde	1.05	0
Dethiophalloïdine	1.0	0
Secophalloïdine	1.0	0

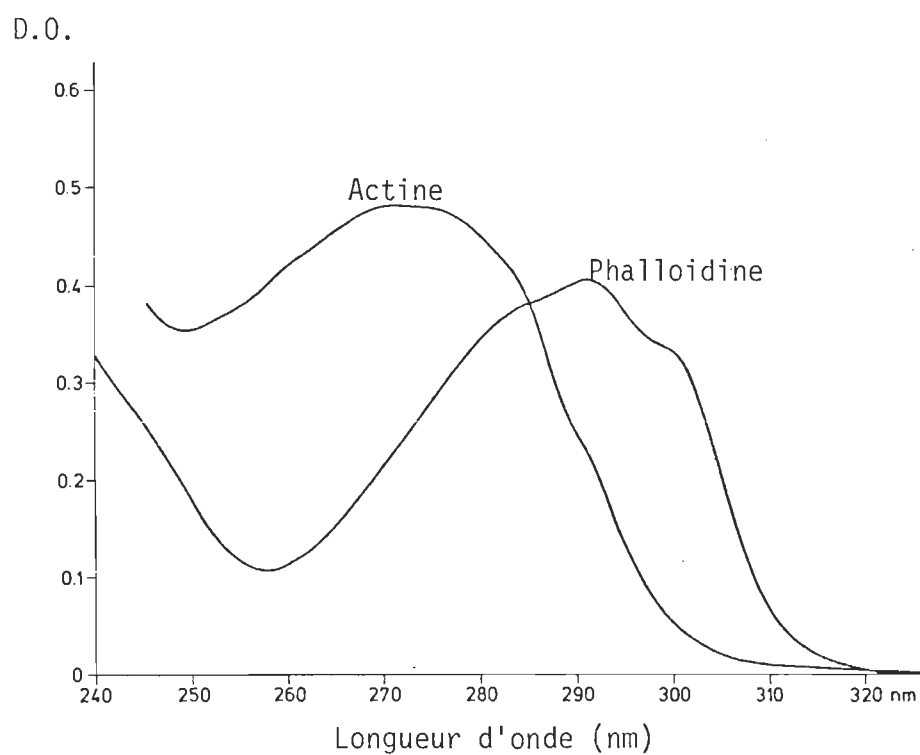


Figure 2 - Spectre d'absorption UV de l'actine (2.65×10^{-5} M) et de la phalloïdine (7.85×10^{-5} M). (D'après Wieland *et al*, 1975 b)

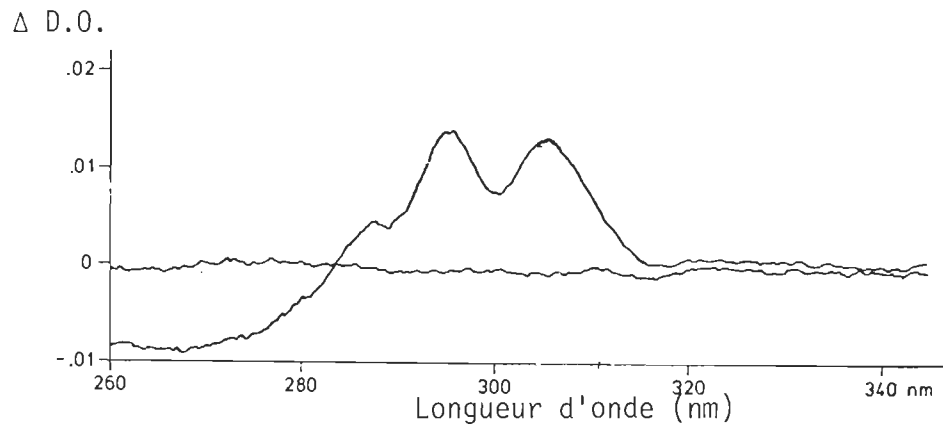


Figure 3 - Spectre différentiel de la combinaison de l'actine (1.09×10^{-5} M) et de la phalloïdine (1.09×10^{-5} M), (d'après Wieland *et al*, 1975 b)

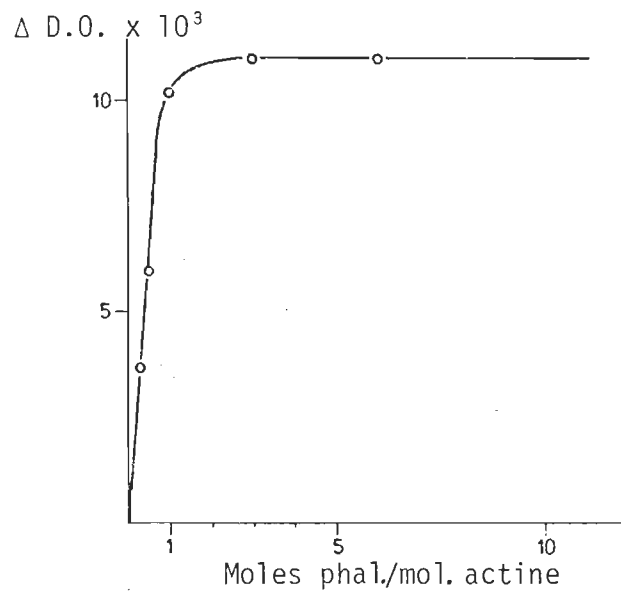


Figure 4 - Changement de densité optique (305 nm) de l'actine (1.09×10^{-5} M) dû à l'augmentation de la concentration de la phalloïdine. (D'après Wieland *et al*, 1975 b)

la phalloïdine à de l'albumine de sérum bovin d'une part (10) et de la secophalloïdine ajoutée à l'actine F d'autre part ont montré seulement de faibles déviations par rapport à la ligne de base. Ces résultats indiquent que la phalloïdine n'interagit pas avec d'autres protéines semblables à l'albumine et que la secophalloïdine, monocycle non toxique, ne se lie pas à l'actine. Ces observations prouvent qu'il existe une interaction spécifique entre la phalloïdine et l'actine. Le changement optique observé au-dessus de 300 nm suggère que la portion indolylthioether de la toxine interagit avec la protéine.

La figure 4 nous fait voir les différentes valeurs d'absorption optique d'un mélange de phalloïdine et d'actine, où l'on augmente le rapport phalloïdine/actine et l'on maintient constante la concentration de l'actine. En tenant compte de l'incertitude de détermination de la protéine et de la limite d'erreur des mesures spectrophotométriques, les sites de liaison de l'actine semblent saturés à un rapport molaire d'environ une molécule de toxine à une unité de monomère d'actine. A des rapports molaires au-dessous de 0.5, les différentes valeurs d'absorption optique varient linéairement avec la concentration de phalloïdine.

2.3- Les amatoxines

Les amatoxines, second groupe de toxines de l'*A. phalloïdes*, sont beaucoup plus toxiques puisqu'elles entraînent la mort des souris

avec des doses de 0.5 mg/kg (souris). Mais l'action de ces toxines est beaucoup plus lente, la mort n'intervenant que 2 à 5 jours après l'intoxication (72). Les amatoxines agissent ici principalement au niveau du tractus gastro-intestinal, du foie et des reins. In vitro, les amatoxines inhibent l'enzyme nucléaire ARN-polymérase II et bloquent ainsi la synthèse protéique (3,4,5,38,62). Ces toxines n'ont montré aucun effet sur l'actine (72).

3- Extraction des toxines de l'*A. phalloïdes*

Les premières extractions de ces toxines remontent en 1793 (63, 74) lorsque Paulet indiqua que le poison de l'*Amanita phalloïdes* était soluble dans l'eau et l'alcool et, qu'il n'était pas détruit par dessiccation, ni par ébullition. Plusieurs études ont été faites par la suite jusqu'à ce qu'en 1937, Lynen et Wieland isolèrent un composé toxique à l'état cristallisé qu'ils nommèrent "phalloïdine" (63,74). Ils obtinrent également un autre produit nommé "amanitine". De nos jours, plusieurs toxines ont été isolées de ce champignon. Les extraits sont séparés premièrement par chromatographie sur colonne de Séphadex LH20 (14), identifiés par chromatographie sur papier (63,74) et purifiés sur couches-minces de silica gel fluorescent (14,58). Ces toxines sont représentées par deux groupes principaux: les amatoxines et les phallotoxines (Fig. I)

4- Structure et toxicité des toxines

Les toxines de l'*Amanita phalloïdes* ont en commun un certain nombre de caractères (Fig. 1); ce sont des cyclopeptides de poids moléculaire voisin de 1000 et ne comprenant qu'un petit nombre d'acides aminés: sept pour les phallotoxines (54) et huit pour les amatoxines (46). Ces cyclopeptides ont en commun un amino-acide gamma-hydroxylé (dérivé de la L-leucine pour les phallotoxines et de la L-isoleucine pour les amatoxines) et un atome de soufre provenant de la cystéine reliée au noyau indol du tryptophane; cette liaison divise le cyclopeptide en deux parties cycliques (46).

Ces peptides montrent tous une absorption intense dans la lumière ultra-violette, avec un maximum proche de 300 nanomètres: soit 292 nanomètres, pour les phallotoxines et 302 nm, pour les amatoxines (63). Cette différence d'absorption serait principalement due à la différence du pont sulfure. Le soufre, dans les molécules d'amatoxines, a une double liaison avec un oxygène (sulfoxyde), contrairement aux phallotoxines qui n'ont pas une telle liaison.

La conformation des phallotoxines est en relation directe avec leur toxicité envers les souris (16). La modification chimique de la structure de ces toxines montre un changement parfois important de la toxicité. La formule générale à la figure 5 nous fait voir le squelette des phallotoxines avec divers groupements (R^1-R^5) et positions (P^6-P^8).

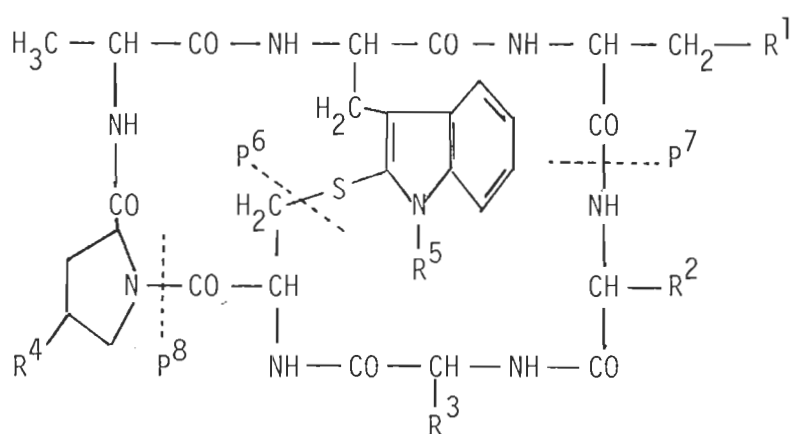


Figure 5 - Formule générale des phallotoxines avec divers groupements (R) et diverses positions (P), (d'après Faulstich et Wieland, 1971)

Le tableau 2 compile les différentes phallotoxines naturelles ou chimiquement transformées; la toxicité de chacune des toxines a été vérifiée pour la souris blanche en déterminant la valeur DL_{50} (dose létale qui tue 50% des individus). Plusieurs toxines, où l'on a synthétisé de nouveaux groupements, ont perdu beaucoup ou totalement de leur toxicité tandis que d'autres sont demeurées très toxiques. Cependant, les toxines ayant subi des coupures de cycle aux positions P^6 , P^7 et P^8 ont perdu leur toxicité. A ma connaissance, la littérature ne rapporte pas ce genre d'étude pour les amatoxines.

TABLEAU 2

Structures et toxicité de différentes phallotoxines naturelles et chimiquement transformées. La DL_{50} est exprimée en mg de toxine par kg de poids corporel de souris blanche, (d'après Faulstich et Wieland, 1971)

Phallotoxines	DL_{50}	Groupements (R)
A- Phallotoxines naturelles		
Ia Phalloïdine	2.0	$R^1 = C(CH_3)OH-CH_2OH$ $R^2 = CH_3$ $R^3 = C(H)OH-CH_3$ (<i>threo</i>) $R^4 = OH$ (<i>allo</i>) $R^5 = H$
Ib Phalloïne	1.5	$R^1 = C(CH_3)OH-CH_3$ R^2-R^5 comme en Ia
Ic Phallisine	2.0-2.5	$R^1 = C(OH)(CH_2OH)_2$ R^2-R^5 comme en Ia
Id Phallacidine	2.5	$R^1 = C(CH_3)OH-CH_2OH$ $R^2 = CH(CH_3)_2$ $R^3 = C(H)OH-CO_2H$ (<i>erythro</i>) $R^4 = OH$ (<i>allo</i>) $R^5 = H$
B- Phallotoxines chimiquement transformées		
Ie Ketophalloïdine	2	$R^1 = CO-CH_3$ R^2-R^5 comme en Ia
If Norphalloïne	1	$R^1 = CH_2CH_3$ R^2-R^5 comme en Ia
Ig Monoacétylphalloïdine	3	$R^1 = C(CH_3)OH-CH_2OAc$ R^2-R^5 comme en Ia
Ih Diacétylphalloïdine I	5-10	$R^1 =$ comme en Ig $R^2 =$ comme en Ia $R^3 = C(H)OAc-CH$ R^4, R^5 comme en Ia
Ii Triacétylphalloïdine	non-toxique	R^1-R^3 comme en Ih R^4, R^5 comme en Ig
Ij N-Méthylphalloïdine	2.5	$R^5 = CH_3$ en Ia
Ik N-Propylphalloïdine	non-toxique	$R^5 = n-C_3H_7$ en Ia
C- Coupure de cycle de toxines		
Il Dethiophalloïdine	non-toxique	coupure en P^6
Im Seco-15-phalloïdine	non-toxique	coupure en P^7
In Seco-18-phallotoxine	non-toxique	coupure en P^8

5- Protection de l'actine par la phalloïdine contre l'action protéolytique de la pronase

Dans notre laboratoire, nous avons étudié l'effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine par la pronase, le tout mesuré par viscosimétrie et par fluorimétrie (55). La figure 6 montre par viscosimétrie l'effet protecteur de différentes concentrations de phalloïdine contre des traitements par la pronase. L'addition de petites quantités de phalloïdine donne une forte protection contre l'action de la pronase. La destruction est totale après 40 heures pour un rapport molaire de 3:1 (phalloïdine:actine G). En l'absence de phalloïdine, l'actine F est détruite en trois heures. L'actine sans phalloïdine et sans pronase n'a presque pas changé après 40 heures.

Après incubation de l'actine F avec la pronase, le spectre d'émission fluorimétrique (Fig. 7) décroît en intensité et on observe un déplacement dans le rouge de 327 à 353 nm. Les changements, observés dans la fluorescence de l'actine F, ont été utilisés pour mesurer le taux de protéolyse de l'actine F et de la protection possible par la phalloïdine. A cause de la grande absorption optique de la phalloïdine au maximum d'excitation de 294 nm, ce qui baisse significativement l'intensité relative de fluorescence de l'actine F (Fig. 7), nous avons introduit un paramètre A qui représente le rapport des intensités (I) de fluorescence, soit $A = (I_{327} / I_{353})_{294}$. De hautes concentrations de phalloïdine ne

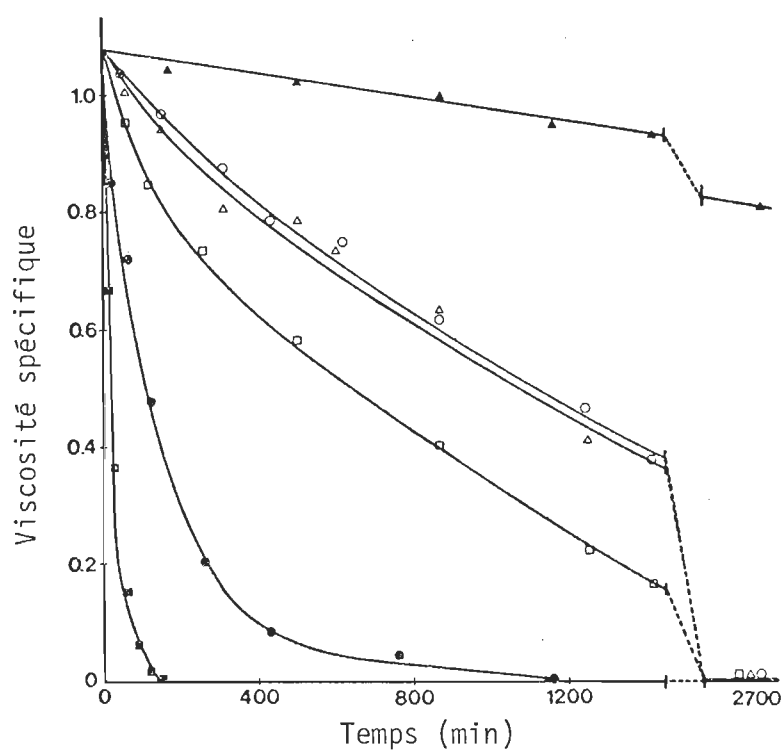


Figure 6 - Effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par viscosimétrie. Concentration de l'actine F, 1.1 mg/ml; concentration de la pronase, 0.11 mg/ml; la concentration de la phalloïdine est exprimée en rapport molaire de phalloïdine par sous-unité d'actine G: ○, 3:1; △, 2:1; □, 1:1; ●, 1:5; ■, sans phalloïdine; ▲, sans phalloïdine et sans pronase. (D'après Pollender et Gruda, 1979)

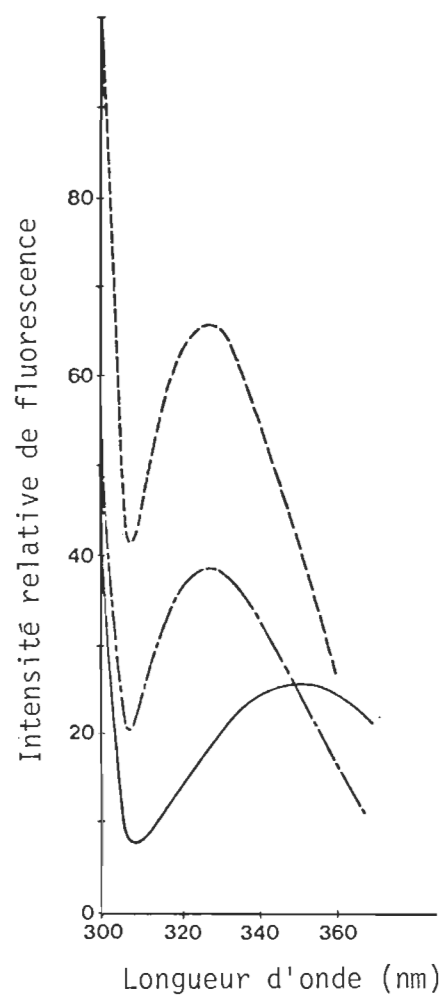


Figure 7 - Spectre de fluorescence de l'actine F native et de l'actine F dénaturée. Concentration de l'actine F, 1 mg/ml; concentration de la pronase, 0.1 mg/ml. —, actine F après protéolysé; — — —, actine F native avec de la phalloïdine 1:1; - - - -, actine F native. (D'après Pollender et Gruda, 1979)

changent pas la valeur A pour l'actine F. La figure 8 nous indique l'effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine, suivi par fluorescence. On note que la protéolyse cause une diminution du rapport A suite à l'augmentation de l'actine dégradée et à la diminution de l'actine native. On remarque que la protection de l'actine F n'augmente plus si on ajoute de la phalloïdine au-delà d'un rapport molaire de phalloïdine par rapport aux sous-unités d'actine G de 2:1. Dans ces cas, la protection atteint les 48 heures. Encore une fois, l'actine sans protection est détruite très rapidement.

La figure 9 montre très bien qu'il n'y a aucune protection de l'actine G par la phalloïdine contre l'action de la pronase. Ces expériences prouvent que la phalloïdine n'est pas un inhibiteur de la pronase et que sa protection n'est attribuable qu'à son effet spécifique sur l'actine F.

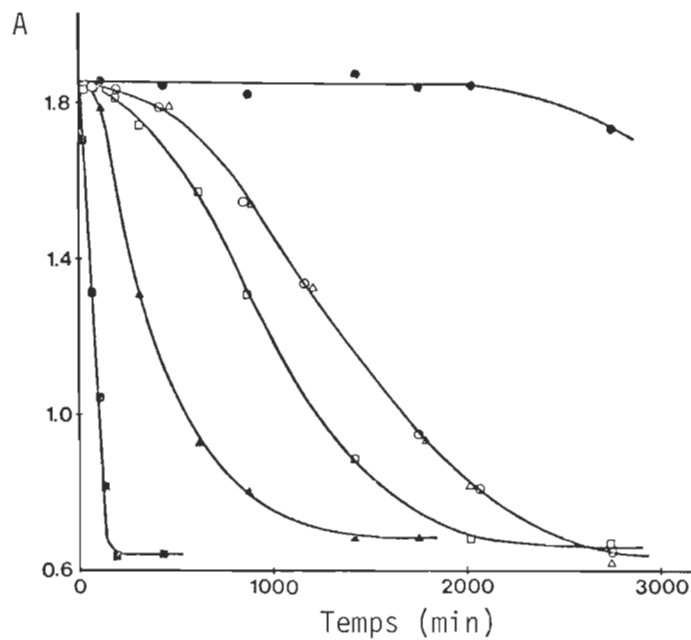


Figure 8 - Effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par fluorimétrie. Concentration de l'actine F, 1.1 mg/ml; concentration de la pronase, 0.11 mg/ml; la concentration de phalloïdine est exprimée en rapport molaire de phalloïdine par sous-unité d'actine G: \circ , 3:1; \triangle , 2:1; \square , 1:1; \blacktriangle , 1:5; \blacksquare , sans phalloïdine; \bullet , sans phalloïdine et sans pronase. (D'après Pollender et Gruda, 1979)

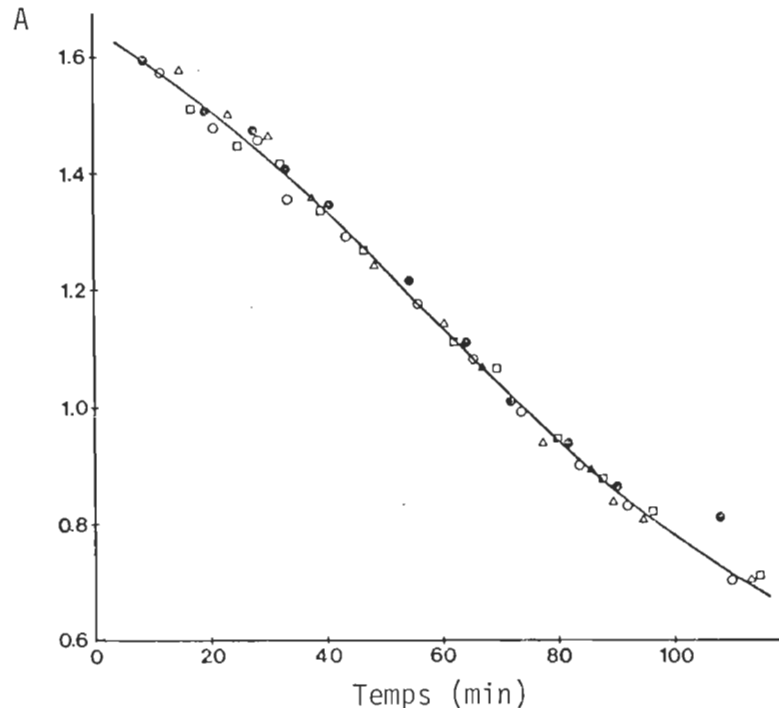


Figure 9 - Effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine G par la pronase, suivi par fluorimétrie. Concentration de l'actine G, 1 mg/ml; concentration de la pronase, 0.04 mg/ml; la concentration de phalloïdine est exprimée en rapport molaire de phalloïdine par sous-unité d'actine G: \circ , 1:1; \triangle , 1:5; \square , 1:10; \bullet , sans phalloïdine. (D'après Pollender et Gruda, 1979)

6- Objectifs

Nous connaissons présentement deux groupes de toxines contenues dans certaines espèces d'Amanites, les amatoxines et les phallotoxines (74). Un troisième groupe de toxines, les virotoxines, qui serait spécifique à l'*A. virosa*, fait actuellement l'objet d'études par certains chercheurs en Europe (72). Etant donné que nous allons travailler avec l'*A. virosa*, ce troisième groupe de toxines nous ouvre de nouveaux horizons.

Comme nous l'avons vu précédemment, les amatoxines sont beaucoup plus virulentes que les phallotoxines (72). Mais un dosage rapide et précis des amatoxines n'a pas encore été mis au point. La seule mise au point d'une méthode de dosage des amatoxines dépasserait le cadre de ce travail. La méthode de dosage des phallotoxines, par contre, a été mise partiellement au point dans notre laboratoire (non publiée), ce qui permettait un dosage assez aisé du contenu de ces toxines dans les champignons étudiés.

Les principaux objectifs de cette maîtrise étaient: 1- vérifier la toxicité des différentes Amanites in vivo; 2- vérifier la méthode de dosage des phallotoxines et l'améliorer si nécessaire; 3- vérifier le contenu en toxines qui agissent sur l'actine de façon semblable à la phalloïdine; 4- essayer de séparer la ou les substances toxiques.

III

MATERIEL ET METHODES

I- Matériel

Actine: préparée à partir de poudre acétonique de muscle de lapin*. La pureté de l'actine est vérifiée par électrophorèse et la contraction est estimée par la méthode de biuret ou l'absorption à 290 nm. L'actine était préparée pas plus de 48 heures avant l'expérience.

Pronase: protéase de *Streptomyces griseus* type IV de Sigma. La solution de pronase était préparée juste avant l'usage.

Phalloïdine, phallisine, α -amatoxine, β -amatoxine: ces toxines

*Préparée selon Spudich, J.A., Watt, S. (1971). J. Biol. Chem., 246: 4866-4871.

sont un don du Docteur Théodor Wieland de l'Institut Max Planck, à Heidelberg en République Fédérale d'Allemagne. Les solutions-mères de ces toxines contenaient 2 mg/ml d'eau.

Les autres produits chimiques étaient tous de qualité analytique.

2- Méthodes

2.1- Récolte et identification des champignons

Les différentes espèces d'Amanites récoltées proviennent du parc national de la Mauricie, dans la région de Shawinigan. C'était un endroit idéal tant pour la qualité et la quantité des champignons que pour la facilité d'accès aux forêts. Les récoltes furent effectuées du début de juillet 1978 à la fin de septembre de la même année.

Les Amanites se distinguent très bien des autres champignons à cause de leur couleur, souvent très vive et de leurs formes attrayantes. De plus, on les reconnaît par leur chapeau circulaire, leur pied central muni d'un anneau ou voile qui recouvrait auparavant les lamelles et à la base du pied, une volve membraneuse ou floconneuse. Après chaque récolte, le chapeau est séparé du pied et déposé sur une feuille, lamelles en premier, afin d'obtenir une sporée. Les spores servent à identifier les Amanites, par microscopie optique à grossissement 45X; la membrane sporique de certaines espèces prend une teinte grise ou bleutée (spore amyloïde) sous l'action du réactif chloral-iodé de Melzer ou reste incolore (spore non amyloïde) sous ce traitement. En s'inspirant de la description botanique de Pomerleau (1976, 1977) (56,57) ainsi que de son aide personnelle, nous avons pu faire une identification exacte de nos champignons. Finalement, les champignons sont conservés par séchage à froid à l'aide d'un lyophilisateur.

2.2- Extraction des toxines

La méthode d'extraction des toxines de champignons est une modification de la méthode de Faulstich *et al* (1973) (14). Nous avons sur la figure 10 une représentation schématique de notre méthode d'extraction. Les portions d'alcool servent à extraire les toxines. Une fois les trois extraits concentrés et dissous dans le mélange eau-méthanol, on extrait les lipides à partir d'un mélange chloroforme:méthanol. Ensuite on extrait de nouveau les toxines qui seraient passées dans la phase chloroforme. Une fois ces trois extraits combinés, évaporés à sec et mis en solution à pH 8, on conserve le tout au congélateur si on ne s'en sert pas immédiatement. Les volumes de ces solutions et le poids sec des champignons sont indiqués dans les résultats (Tableau 3).

2.3- Toxicité chez les souris

On a vérifié la toxicité des champignons sur des souris femelles blanches albinos d'environ 23 g de poids corporel. Elles provenaient de la Canadian Breeding Farm Laboratories à Saint-Constant, Québec. Toutes les souris ont reçu une dose de 0.2 cc de solution-mère et de ses dilutions, injectée par voie péritonéale. Un maximum de 24 heures était accordé pour déterminer s'il y avait mortalité.

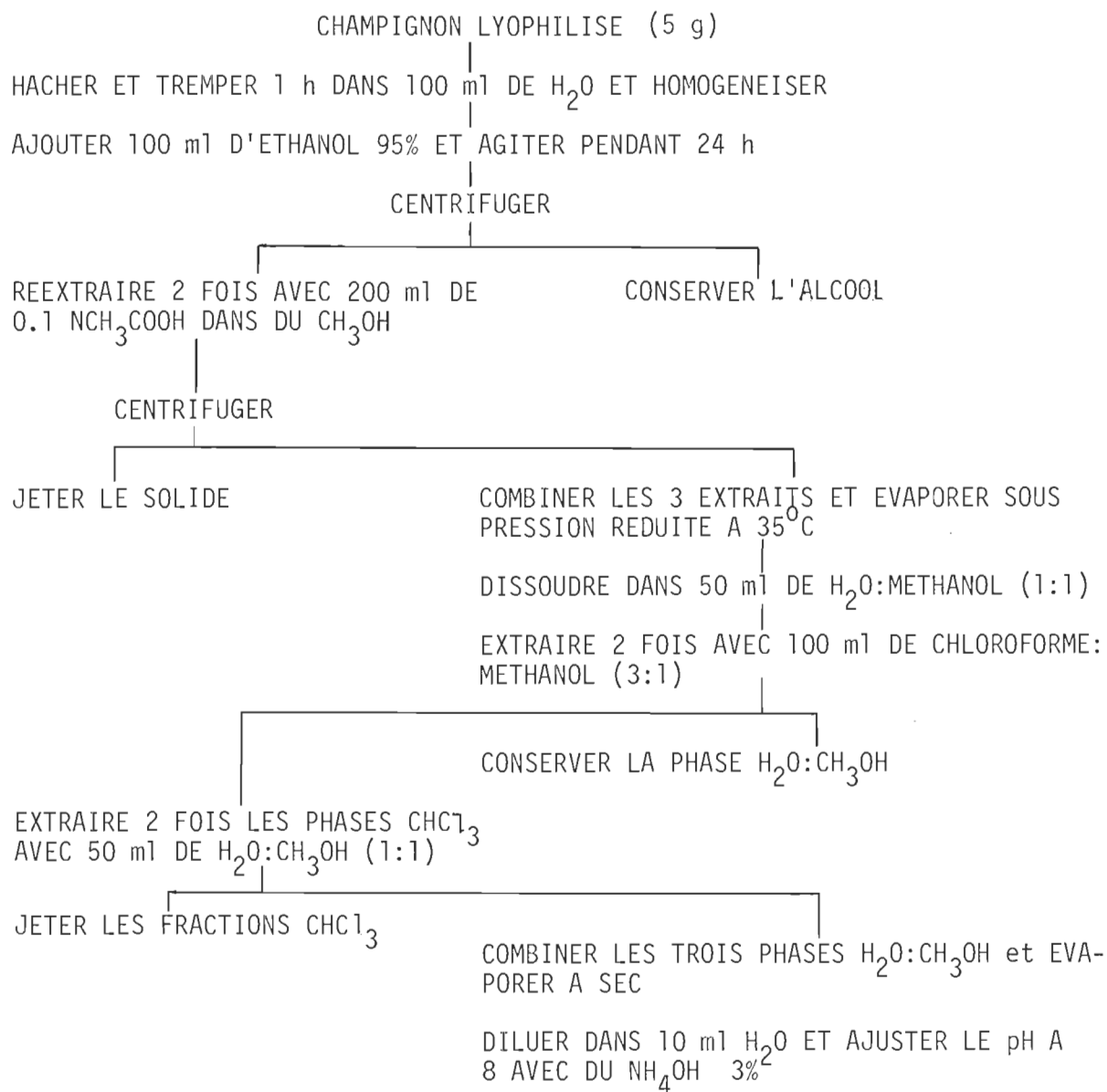


Figure 10 - Représentation schématique de la méthode d'extraction des toxines (d'après Faulstich *et al*, 1973)

2.4- Détermination de la DL_{50} chez les souris

Pour les espèces qui s'avéraient toxiques, une étude de DL_{50} était entreprise dans les mêmes conditions expérimentales. Nous commençons par accomplir nos intoxications avec un étalonnage très large de dilution, soit de 1/10 (0.10) à 1/50 (0.02), pour déterminer approximativement les limites de notre étude. Ensuite il nous suffisait de travailler avec des dilutions plus rapprochées de la valeur approximative de DL_{50} trouvée.

Cependant pour faciliter les calculs, nous n'avons pas travaillé avec des fractions comme 1/9.5; au lieu de cela, nous nous sommes servis de fractions décimales. Par exemple, une valeur de 0.100 représente un rapport de 1/10 ce qui revient à dire qu'expérimentalement nous mettions 0.500 ml d'extrait dans 4.500 d'eau. La précision des pipettes utilisées était choisie selon les limites d'étalonnage des dilutions. Pour donner une représentation significative de ces résultats et trouver la DL_{50} , nous avons traité nos données par ordinateur. Nous nous sommes servis d'un programme informatique basé sur l'analyse probit de Daum (8). Ce genre de programme nous donne directement la DL_{50} , exprimée en termes de dilution de la solution-mère.

2.5- Dosage des toxines par chromatographie en phase liquide

Les toxines ont été étudiées par chromatographie en phase liquide à hautes pressions. Le chromatographe était de marque Waters Associate, modèle 440, avec un détecteur d'absorbance à une longueur d'onde de 280 nm. La colonne utilisée était une μ Bondapark C_{18} , constituée de couches monomoléculaires d'organolisone lié en permanence au μ porasil (particule de silica très polaire, très poreuse). La colonne avait une longueur de 30 cm et un diamètre interne de 3.9 mm. Les injections étaient de l'ordre de 2.5 μ l. Plusieurs solvants ont été utilisés pour obtenir une meilleure séparation: du méthanol pur, du méthanol:eau à différentes concentrations, un tampon bicarbonate d'ammonium 0.1M + azide de sodium 0.02%, du tampon:méthanol à différentes concentrations, un gradient de densité d'acétonitrile et de l'eau.

2.6- Dosage de l'activité de protection de l'actine F

2.6I- Protection de l'actine suivie par fluorimétrie

Les extraits étaient étudiés par fluorimétrie selon la méthode mise au point dans notre laboratoire (55) et basée sur la protection de l'actine F par la phalloïdine contre l'action protéolytique de la pronase. Le fluorimètre était de marque Perkin-Elmer MPF-2A et la lampe, une Perkin-Elmer I50 Xénon.

La protéolyse de l'actine se produit dans un mélange tampon de 0.1M de KCl, 0.02M de tris-HCl à pH 7.6, de 0.02% de NaN_3 , 1mM de MgCl_2 , de 0.2mM de ATP, 0.2mM de CaCl_2 , et de 0.5mM de mercaptoéthanol. L'actine, la phalloïdine et les toxines inconnues (solutions-mères) sont ajoutées quatre heures avant la pronase. La température d'incubation est de 37°C. La concentration initiale de l'actine est de 1.25 mg/ml, afin qu'on obtienne une concentration de 1 mg/ml pour l'expérience. La pronase est initialement à 2 mg/ml pour obtenir une concentration finale de 0.1 mg/ml (1/10 de la concentration de l'actine). Pour chacune des expériences, on mettait dans les cuvettes 2.4 ml d'actine, 0.15 ml de pronase, 30 μl de toxines et de 0.42 ml de tampon. Dans l'expérience de contrôle il n'avait pas de toxines, donc on ajoutait 0.45 ml de tampon.

2.62- Formule et méthode de dosage basées sur la fluorimétrie

Les méthodes de dosage employées jusqu'à ce jour pour étudier les différentes toxines étaient non spécifiques et peu sensibles. Dans notre laboratoire, une méthode spécifique de détermination semi-quantitative des toxines (non publiée) a été mise au point et est basée sur la protection qu'exercent ces toxines sur l'actine F, mesurée par fluorescence.

Nous savons que l'actine F non dégradée a un spectre d'émission de fluorescence avec un maximum de 327 nm et l'actine F dégradée avec un maximum de 353 nm. Il s'agissait donc de suivre les changements de fluorescence dans le temps. La première lecture doit être prise le plus rapidement

possible parce qu'elle correspond au temps 0. Ensuite les lectures sont prises aux quinze minutes et plus l'expérience se déroule plus ce temps est augmenté.

La figure II (onze) nous définit bien les constituants de la formule mise au point dans notre laboratoire et la figure I2 nous fournit un exemple d'application de celle-ci. Cette formule nous donne la masse équivalente en phalloïdine par gramme de champignon sec étudié, que l'on identifie comme l'activité de protection de l'actine. On part donc d'une concentration connue de phalloïdine et on compare son effet protecteur avec des toxines inconnues contre la protéolyse de l'actine par la pronase, et on obtient ainsi une quantité équivalente de toxines.

Nous devons, en premier lieu, examiner la figure I2. En ordonnée, nous avons le rapport d'intensité A ($A = I_{327}/I_{353}$) qui est obtenu en mesurant la hauteur maximum de l'intensité à 327 nm (actine non dégradée) sur celle à 353 nm (actine dégradée). Ces valeurs sont mesurées en mm sur les feuilles de résultats de fluorescence. En abscisse, nous avons le temps en minutes. Pour cette formule nous avons besoin du temps de demi-vie ($T_{I/2}$) de chaque échantillon et pour cela on doit trouver d'abord la valeur $A_{I/2}$ ($A_{I/2} = A_{\max} + A_{\min}/2$) pour l'actine sans protection. On peut ensuite trouver graphiquement tous les temps de demi-vie en traçant une ligne à la valeur $A_{I/2}$.

$$M(EQ.PH.) = C \text{ PH.ST.} \times \frac{T_{\frac{1}{2}} \text{ ECHT.} - T_{\frac{1}{2}} \text{ ACTINE SANS PROTECTION}}{T_{\frac{1}{2}} \text{ PH.ST.} - T_{\frac{1}{2}} \text{ ACTINE SANS PROTECTION}} \times \frac{\text{DIL.} \times \text{VOL.}}{\text{MASSE ECHT.}}$$

M(EQ.PH.) = MASSE EQUIVALENTE EN PHALLOIDINE PAR g D'ECHANTILLON SEC ETUDIE

C PH.ST. = CONCENTRATION DU STANDARD DE PHALLOIDINE

$T_{\frac{1}{2}}$ = TEMPS REQUIS POUR OBTENIR UNE VALEUR $A = \frac{A_{\max} + A_{\min}}{2}$,
 A ETANT L'INTENSITE DE FLUORESCENCE A 327 nm PAR RAPPORT A CELLE
 A 353 nm

Figure 11 - Formule de dosage des phallotoxines et de substances analogues ayant un effet protecteur sur l'actine F

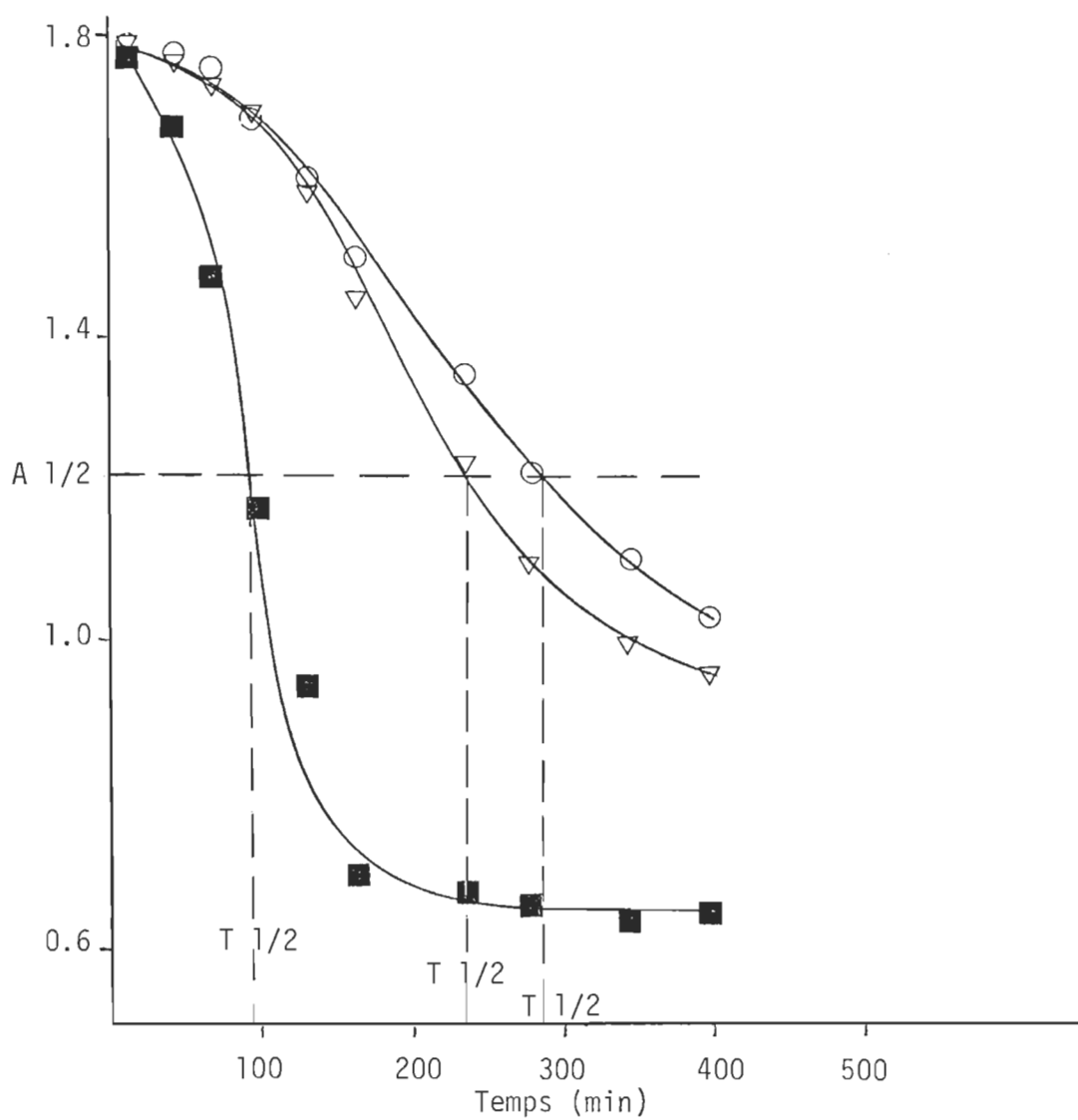


Figure 12 - Représentation de la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivie par fluorimétrie. Les concentrations sont exprimées en termes de dilution: ▽, 1:5 de phalloïdine (initialement 2 mg/ml); O, 1:5 d'un extrait d'*A. virosa*; ■, sans toxine.

Le principe de la formule, c'est qu'on doit trouver le $T_{I/2}$ de l'échantillon inconnu qui est le plus près du $T_{I/2}$ de la phalloïdine standard; ici le $T_{I/2}$ de l'actine sans protection sert de temps de référence. Ensuite, on applique ces données à la formule en tenant compte de la masse de l'échantillon sec et des différentes dilutions.

2.63- Protection de l'actine suivie par viscosimétrie

Cette méthode est aussi basée sur la capacité des toxines à protéger l'actine F contre la protéolyse par la pronase. La viscosité était mesurée dans des viscosimètres Cannon-Feske avec un débit d'environ 43 secondes pour la solution-tampon à une température de 37°C. Les viscosimètres étaient placés dans un bassin d'eau à température contrôlée de 37°C. Les concentrations d'actine et de pronase sont les mêmes que par la méthode de fluorimétrie. Le tampon demeurerait lui aussi semblable et on notait les changements de viscosité dans le temps.

Dans les viscosimètres on ajoutait 4 ml d'actine, 0.25 ml de pronase, 30 µl de toxines et 0.72 ml de tampon. L'expérience-contrôle contenait 0.75 ml de tampon et pas de toxines.

2.7- Chromatographie sur colonne et spectroscopie UV

Les différents échantillons qui ont montré une protection de

l'actine contre la pronase ont été séparés par chromatographie sur colonne. Nous avons un montage spécial pour notre chromatographie; il consistait en trois colonnes connectées en série dont le solvant circulait à l'aide d'une pompe péristaltique branchée sur la première colonne. A la sortie (3^e colonne), nous retrouvions un collecteur de fraction qui recueillait des échantillons d'environ 11 ml/ 17 min. Toutes les fractions obtenues étaient examinées par spectroscopie UV entre 240 et 340 nm, afin d'obtenir le spectre d'élution.

Les colonnes, de marque Pharmacia, avaient 100 cm de long et 2.6 cm de diamètre interne. La phase solide était du Sephadex LH-20, formé de gel dextran qui possède des propriétés hydrophiles et lipophiles. Le solvant était un tampon bicarbonate d'ammonium (0.1M), avec de l'azide de sodium 0.02% ce qui donnait un pH de 8. La pompe était de marque Pharmacia et le collecteur de fraction, un LKB. Le spectrophotomètre était un Perkin-Elmer Coleman 824.

IV

RESULTATS

1- Espèces d'Amanites

Durant les trois mois de cueillette, nous avons trouvé huit espèces d'Amanites: 1- *Amanita brunnescens* (Amanite brunissante), 2- *Amanita citrina* (Amanite citrine), 3- *A. flavoconia* (A. à verrues jaunes), 4- *A. flavorubens* (A. jaune rougissante), 5- *A. muscaria* (A. tue-mouches), 6- *A. rubescens* (A. rougissante), 7- *A. tomentella* (A. pulvérolente), 8- *A. virosa* (A. vireuse). La description botanique des différentes espèces d'Amanites trouvées se lit comme suit:

1- *Amanita brunnescens* (Atkinson):

chapeau de 5 à 11 cm d'abord conique, puis campanulé et étalé; légèrement visqueux, brun olivâtre ou plus sombre, pâle à la marge et quelquefois plus blanc; vergeté de fines fibrilles

brunâtres ou plus pâles, souvent parsemé de lambeaux blanchâtres du voile qui persiste surtout au centre à marge lisse. Chair molle, fragile et blanche. Lamelles libres, serrées, inégales à rebord un peu floconneux. Pied élargi à la base, terminé en un gros bulbe marginé et fendu plusieurs fois de haut en bas, blanchâtre et souvent brunâtre vers le haut. Anneau membraneux, blanc et rabattu. Voile plutôt floconneuse, blanchâtre ou grisâtre. Spores blanches amyloïdes, $6.1-11.4 \times 6.1-11.4 \mu\text{m}$.

2- *Amanita citrina* (Roques):

chapeau de 4 à 8 cm rond puis étalé à marge lisse, jaune citron, jaune paille ou presque blanc, orné de verrues ou de débris de voile floconneux, blanc et visqueux. Chair blanche. Lamelles libres, serrées, blanches ou crème. Pied subcylindrique, terminé par un bulbe marginé et bordé d'une volve membraneuse, muni d'un anneau blanc jaunâtre, pendant et membraneux. Spores blanches en tas, rondes et amyloïdes, $7.0-10.5 \times 7.0-10.5 \mu\text{m}$.

3- *Amanita flavoconia* (Atkinson):

chapeau de 3 à 7 cm convexe puis étalé, humide, jaune ou orangé, couvert de verrues jaunes, floconneuses, faciles à détacher, à marge lisse. Chair blanche et mince. Lamelles libres, blanches, serrées, ventrues à rebord ventriculé. Pied cylindrique, blanchâtre, jaune ou orangé, écailleux, peu ou point bulbeux. Anneau membra-

neux et jaune. Volve fugace, réduite à des plaques jaunes floconneuses sur le bulbe. Spores blanches, amyloïdes, ovales ou elliptiques, 7.0-11.0 X 5.2-7.0 μm .

4- *Amanita flavorubens* (Berkeley et Montagne):

chapeau de 5 à 10 cm convexe puis étalé, orné de verrues pyramidales ou floconneuses, jaune ocracé à pellicules jaune citron, jaune abricot à marge lisse ou faiblement striolée. Chair mince, blanche devenant rougeâtre à la cassure. Lamelles libres blanches et serrées. Pied plein puis creux, cylindrique ou élargi vers la base jaune citron, terminé par un bulbe peu marqué, orné de quelques débris floconneux du voile jaune. Chair à la base prenant une couleur brun mûre ou rougeâtre. Spores blanches, amyloïdes, ovales ou elliptiques, 7.0-11.4 X 5.2-7.0 μm .

5- *Amanita muscaria* (Fries):

chapeau de 8 à 20 cm ovale puis convexe et enfin plan, visqueux dans le jeune âge, jaune, rouge orangé ou rouge vif, devenant plus pâle en vieillissant, moucheté d'un grand nombre de flocons ou verrues blanches ou jaunes qui partent à la pluie, à marge striée. Chair blanche et jaune sous le cuticule. Lamelles libres ou rejoignant le pied par une ligne, blanche ou avec une lisière jaune sur le rebord. Pied long, subcylindrique, creux, blanc ou jaunâtre sur un bulbe ovale, floconneux ou lacéré plus haut. Anneau épais et blanc. Volve fugace et réduite à des écailles ou des bourrelets jaunes. Spores blanches et non amyloïdes, 5.2-9.6 X 8.7-12.1 μm .

6- *Amanita rubescens* (Fries):

chapeau de 5 à 12 cm ovale puis convexe et étalé, un peu visqueux, blanchâtre ou brunâtre puis d'un roux vineux, couvert de verrues grisâtres ou brunes, à marge peu striée. Chair molle, mince, blanchâtre et rougissant lentement à la cassure. Lamelles étroites, libres, serrées, blanches, piquées de taches roses vineuses. Pied épais si vers le bas, coloré comme le chapeau devenant creux en vieillissant, terminé par un bulbe renflé. Anneau large, rabattu, strié, blanc ou rougêâtre. Volve fugace, représentée par de simples squamules grisâtres qui restent souvent dans le sol. Spores blanches, amyloïdes, elliptiques, 3.0-11.4 X 4.4-6.7 μm .

7- *Amanita tomentella* (Krombholz):

chapeau de 4 à 9 cm convexe puis étalé, visqueux puis sec, brun lustré, brun grisâtre, couvert de débris pulvérulents ou floconneux du voile, légèrement vergeté de fibrilles innées, à marge lisse. Chair blanche parfois grisâtre sous la pellicule. Lamelles blanches, libres ou unies au pied par un filet, floconneuses à l'arête. Pied élancé ou trapu, cylindrique ou aminci vers le sommet, terminé par un gros bulbe marginé, muni d'un anneau membraneux, rabattu, gris cendré devenant noirâtre, farci plus creux, blanc au-dessus de l'anneau, chiné ou marbré de lignes grisâtres en dessous. Volve floconneuse, blanche puis grisâtre, bordant parfois le bulbe, fugace. Spores blanches, amyloïdes et globulaires, 6.1-11.4 X 7.0-10.5 μm .

8- *Amanita virosa* (Fries):

(ange de la mort) chapeau de 5 à 12 cm ovale, convexe puis étalé, blanc pur jaunissant parfois au centre, un peu visqueux. Chair blanche et ferme. Lamelles libres ou réunies au pied par une ligne, ventrues, blanches à rebord floconneux. Pied blanc plutôt gros et long (8-20 cm), cylindrique ou rétréci vers le sommet, creux, glabré ou légèrement écailleux, avec un bulbe ovoïde. Anneau blanc, strié ou rabattu. Volve ferme, épaisse engainant le bulbe et étroitement appliquée sur lui. Spores blanches, amyloïdes, 6.1-14.0 (7.5-10.1) X 5.2-12.2 (7.5-10.1) μm .

2- Extraction des toxines d'Amanites

L'ordre des extractions s'est fait selon les espèces d'Amanites que nous récoltions en premier lieu. Certaines espèces reviennent souvent à cause de leur grande disponibilité, tandis que d'autres telles *A. rubescens* et *A. tomentella* n'apparaissent qu'une seule fois. Au tableau 3 nous avons les différentes espèces d'Amanites étudiées. Nous retrouvons aussi le numéro d'extrait dont nous nous sommes servis tout au long de cette thèse, ainsi que le poids sec et le volume final d'extrait (solution-mère).

TABLEAU 3

Extraits d'Amanites

Espèce d'Amanites	No d'extrait	Poids sec (g)	Volume final (ml)
<i>VIROSA</i>	1	3.83	13.2
<i>BRUNNESCENS</i>	2	7.97	12.9
<i>VIROSA</i>	3	4.50	11.8
<i>CITRINA</i>	4	1.50	10.8
<i>VIROSA</i>	5	3.76	12.1
<i>BRUNNESCENS</i>	6	3.95	12.1
<i>VIROSA</i>	7	3.42	12.2
<i>BRUNNESCENS</i>	8	6.50	11.9
<i>VIROSA</i>	9	4.70	12.1
<i>BRUNNESCENS</i>	10	4.70	13.0
<i>FLAVOCONIA</i>	11	3.13	11.8
<i>FLAVOCONIA</i>	12	1.96	11.1
<i>FLAVORUBENS</i>	13	3.25	11.4
<i>FLAVORUBENS</i>	14	3.53	10.8
<i>MUSCARIA</i>	15	10.18	14.3
<i>MUSCARIA</i>	16	6.61	11.9
<i>RUBESCENS</i>	17	7.77	13.1
<i>CITRINA</i>	18	2.67	11.2
<i>CITRINA</i>	19	1.34	10.5
<i>TOMENTELLA</i>	20	1.31	10.5

3- Toxicité des champignons sur les souris

La toxicité des huit espèces d'Amanites a été expérimentée sur des souris blanches. Nous avons utilisé deux champignons par espèce, à l'exception de l'*A. rubescens* et l'*A. tomentella* dont nous n'avions qu'un échantillon de chaque. Nous retrouvons au tableau 4 les résultats de la toxicité des différentes espèces d'Amanites. Pour chaque extrait de champignon, on utilisait quatre concentrations soit, la solution-mère et les dilutions 1:5, 1:10 et 1:100. Pour chacune des concentrations, nous intoxiquions deux souris. L'*A. muscaria* et l'*A. rubescens* se sont montrées toxiques avec la solution-mère, mais pas aux autres dilutions. L'*A. virosa*, pour sa part, s'est montrée très toxique et nous avons décidé d'entreprendre une étude de DL_{50} .

L'*A. rubescens* et l'*A. muscaria* ont entraîné la mort des souris en moins de 45 minutes. Contrairement au cas de l'*A. rubescens* ou de l'*A. virosa* qui, même aux doses léthales, n'ont occasionné aucun trouble nerveux, l'*A. muscaria*, à doses léthales, a eu un effet bien spécifique sur le comportement des souris; rapidement après l'injection (15-20 min), les souris devenaient très agitées, fébriles et sautaient dans tous les sens. Ensuite, elles tombaient en convulsions et mouraient 40 à 45 minutes après l'injection.

TABLEAU 4

Effet des extraits d'Amanites sur les souris blanches

Espèce d'Amanites	Dilution de l'extrait			
	0	1:5	1:10	1:100
<i>BRUNNESENCENS</i>	V	V	V	V
<i>CITRINA</i>	V	V	V	V
<i>FLAVOCONIA</i>	V	V	V	V
<i>FLAVORUBENS</i>	V	V	V	V
<i>MUSCARIA</i>	M	V	V	V
<i>RUBESCENS</i>	M	V	V	V
<i>TOMENTELLA</i>	V	V	V	V
<i>VIROSA</i>	M	M	M	V

V = Vivant

M = Mort

4- Détermination de la DL_{50} de l'extrait no 1 d'*A. virosa*

Au tableau 5, nous avons établi une échelle de dilution pour déterminer approximativement la DL_{50} de l'extrait no 1 d'*A. virosa*. Nous n'avons utilisé qu'une souris par dilution. On s'aperçoit qu'à une dilution de 0.10, nous avons mortalité et qu'à celle de 0.05, nous n'en avons pas. Nous avons établi une deuxième échelle de dilution pour avoir une idée plus précise de la valeur de la DL_{50} . On retrouve ces résultats au tableau 6 où cette fois les dilutions varient de 0.500 à 0.050. Maintenant nous savons que la DL_{50} se situe aux environs de la dilution 0.100. Nous avons travaillé avec une échelle de dilution beaucoup plus courte (de 0.080 à 0.130) et avec de très faibles différences entre les valeurs (Tableau 7).

Au tableau 7, nous avons cette fois-ci les résultats exprimés en pourcentage de mortalité. A partir de ces résultats, l'ordinateur nous fournit directement la dilution correspondant à la DL_{50} ; cette valeur est de 0.103 ± 0.013 ; la valeur 0.013 est l'intervalle de confiance à 95%, c'est-à-dire qu'on a 95% de chances de retrouver nos valeurs expérimentales dans cet intervalle. Le programme a d'ailleurs démontré qu'il y avait corrélation significative dans les résultats: test de t ($p \leq 0.05$) positif; ce test vérifie la linéarité de la droite et montre que nous avons seulement 5% de chances de retrouver des valeurs en dehors de cette droite. L'ordinateur nous évite aussi l'imprécision que peut amener l'extrapolation sur un graphique.

TABLEAU 5

Effet toxique de différentes dilutions de l'extrait no 1 d'*A. virosa*
sur les souris blanches

Dilution	0.10	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
Mortalité	M	V	V	V	V	V

TABLEAU 6

Effet toxique de différentes dilutions de l'extrait no 1 d'*A. virosa*
sur les souris blanches

Dilution	0.13	0.12	0.11	0.10	0.09	0.08	0.07	0.06
Mortalité	M	M	M	M	V	V	V	V

TABLEAU 7

Effet toxique de différentes dilutions de l'extrait no 1 d'*A. virosa*
sur les souris blanches, exprimé en pourcentage de mortalité

Dilution	.080	.090	.100	.110	.105	.115	.120	.130
Nb de souris	10	10	15	10	10	15	13	10
% Mortalité	10	40	60	70	60	47	54	90

M = Mort

V = Vivant

A partir de la valeur de dilution de 0.103 obtenue par le programme probit de Daum (1969) (8), du poids sec des champignons et du poids des souris, nous obtenons une DL_{50} de 260 mg de champignon sec par kg de poids corporel de souris.

5- Etude de toxines connues par chromatographie en phase liquide à haute pression

Nous voulions par chromatographie en phase liquide à haute pression, séparer et identifier les différentes phallotoxines et amatoxines directement à partir des extraits bruts. Ceci aurait pu nous épargner les séparations très lentes sur colonnes conventionnelles. Nous avons tout d'abord tenté à l'aide de quatre toxines, décrites comme étant pures et provenant du laboratoire de Théodor Wieland, d'obtenir des temps de rétention spécifiques. Mais quelques problèmes sont intervenus sur la détermination précise de ces pics; pour une toxine seule, on pouvait avoir entre deux et quatre pics. Les autres toxines donnaient des pics souvent avec les mêmes temps de rétention. Et si on essayait de faire un mélange des quatre toxines, nous obtenions les mêmes pics que dans le cas d'une seule toxine. Au tableau 8, nous retrouvons les différentes toxines et solvants utilisés ainsi que le nombre de pics obtenus. On s'aperçoit, par exemple, que la phalloïdine séparée dans un solvant de tampon bicarbonate donne trois pics, l' α -amanitine en donne deux et la phalisine en donne quatre; le mélange de ces trois toxines et de la β -amanitine donne aussi quatre pics. Pour mieux visualiser le problème, nous voyons à la figure 13 un spectre d'élution de la phalloïdine seule et un spectre du mélange des quatre toxines. Le solvant pour cette expérience était du tampon/méthanol (1/2). Les deux spectres nous donnent des temps de rétention presque identiques avec des spectres d'élution semblables.

TABLEAU 8

Etude de toxines connues par chromatographie en phase liquide à haute pression

Toxine	Solvant	Nb de pics
Phalloïdine	tampon(bicarbonate de sodium)	3
α amanitine	" "	2
Phallisine	" "	4
4 toxines connues	" "	4
Phalloïdine	tampon/méthanol(550/275)	4
Phalloïdine	" (300/600)	2
4 toxines connues	" (300/600)	2
Phalloïdine	" (500/500)	2
Phalloïdine	" (555/275)	4
Phalloïdine	méthanol pur	2
Phalloïdine	méthanol/eau(50/50)	4
α amanitine	" (70/30)	2
β amanitine	" "	2
Phalloïdine	gradient de densité	3
	acétone/eau(50/50)	
4 toxines connues	gradient de densité	6
	acétone/eau(50/50)	

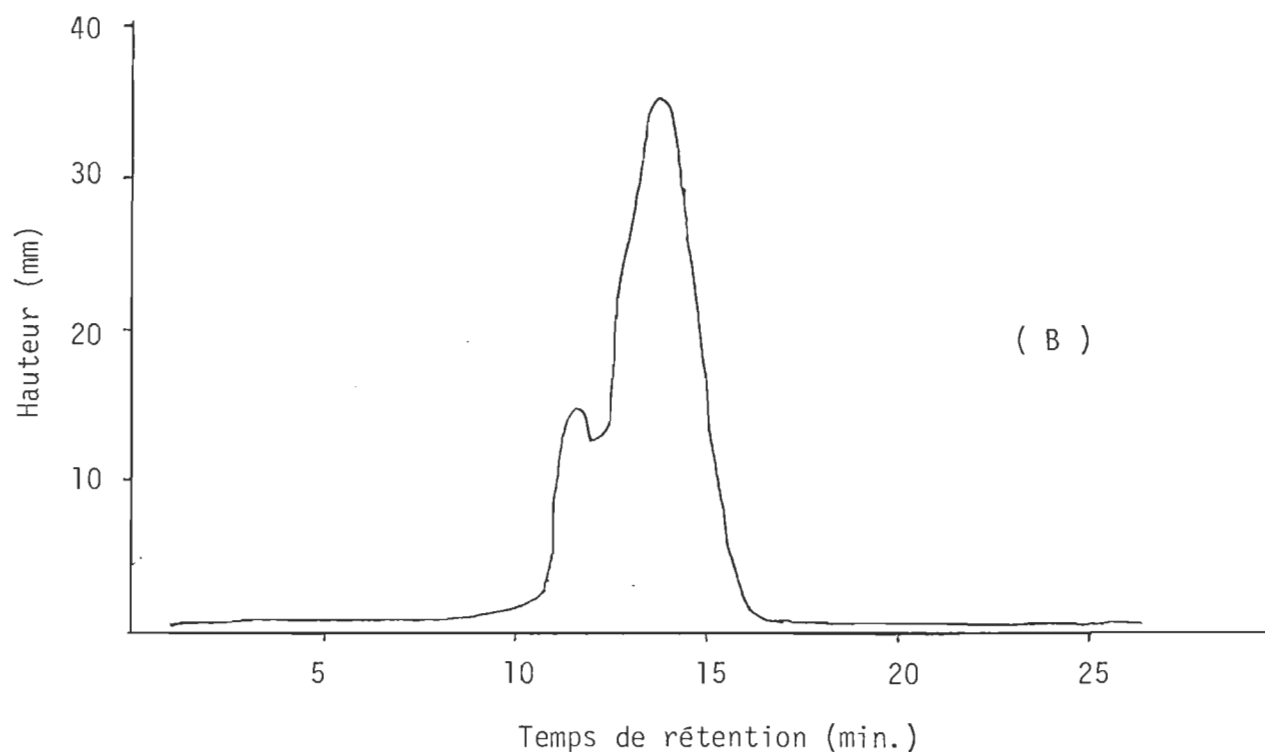
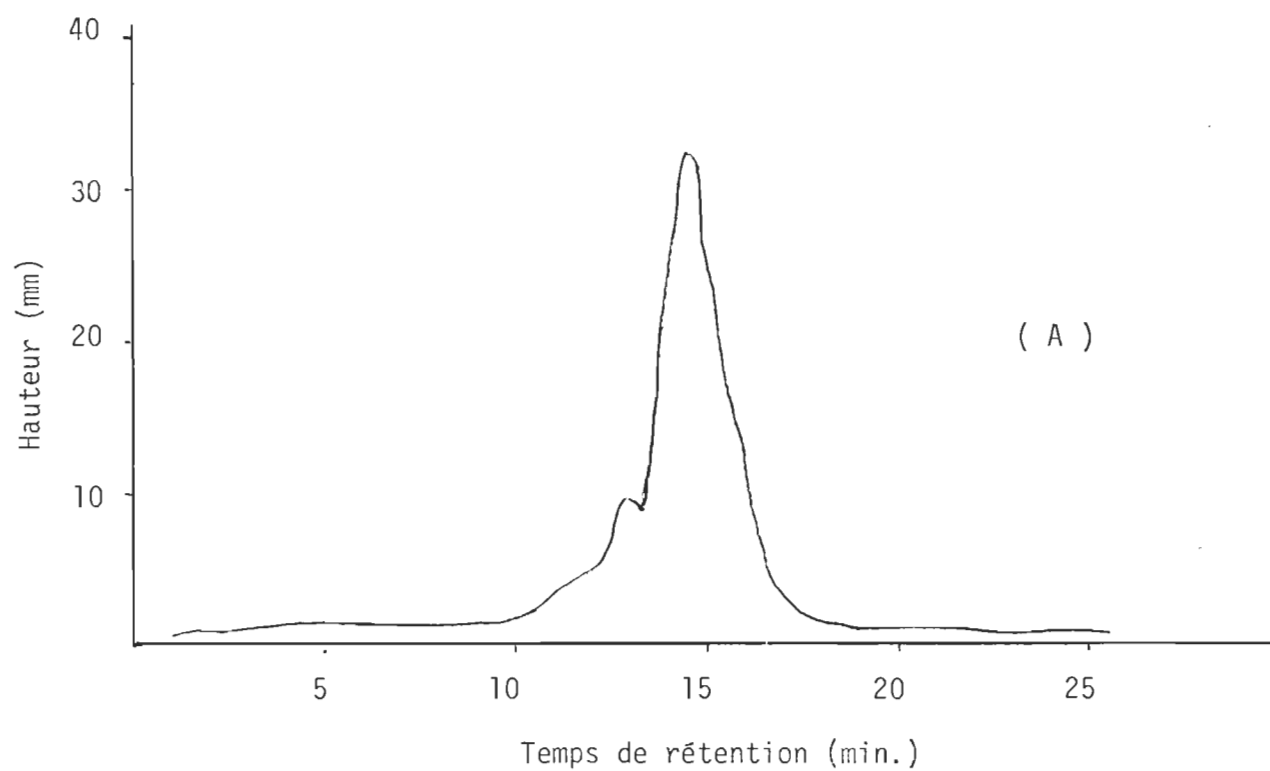


Figure 13 - Spectre d'élution de toxines séparées par chromatographie en phase liquide à haute pression. Données expérimentales: sensibilité, 0.5; λ , 280 nm; débit, 0.3 ml/min; papier, 0.2 po/min; solvant, tampon de bicarbonate de sodium/méthanol (1/2). (A) phalloïdine seule (B) mélange de α et β amanitine, de phalloïdine et de phalloïdine

Ces inconvénients nous ont empêché naturellement d'établir une courbe d'étalonnage qui nous aurait permis probablement d'analyser qualitativement et quantitativement les toxines contenues dans les extraits bruts. Ces résultats portent à croire que les toxines obtenues de Wieland n'étaient pas de la pureté à laquelle on s'attendait.

6- Etude par fluorimétrie de la protection de l'actine F par des extraits de champignons

Nous avons finalement opté pour la méthode fluorimétrique basée sur la protection de l'actine F par la phalloïdine. La figure 14 nous montre les effets des différents extraits de champignons sur l'actine. Les Amanites qui ont montré un effet semblable sont représentées par *A. spp.* Sur ce graphique, on remarque que l'*A. virosa* protège fortement l'actine contre la protéolyse. L'*A. citrina* donne aussi une certaine protection, ce qui est assez inattendu étant donné son manque de toxicité. Les autres espèces (*A. spp.*) incluant l'*A. rubescens* et l'*A. muscaria* n'ont aucunement protégé l'actine.

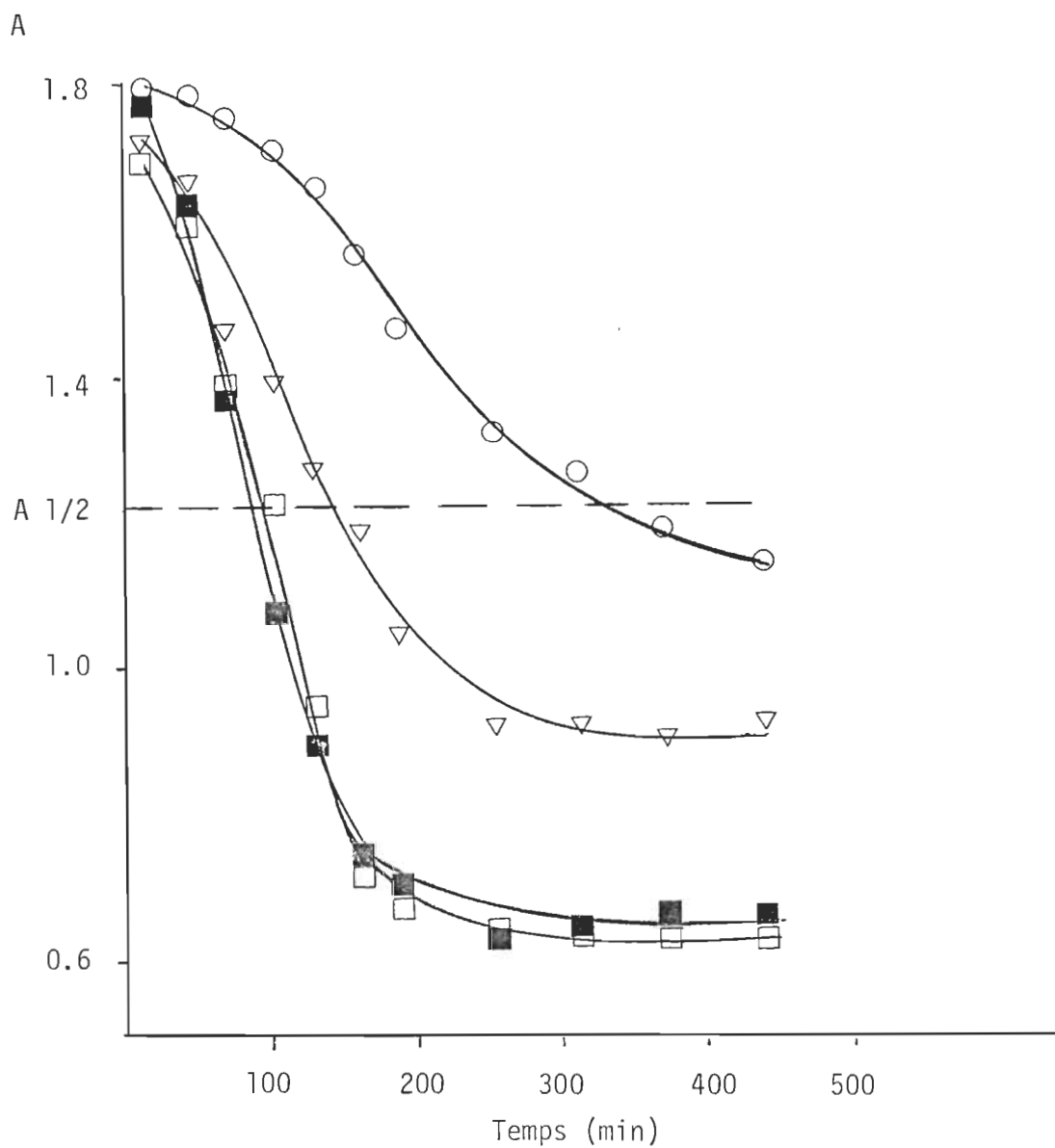


Figure 14 - Effet des extraits d'Amanites sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par fluorimétrie. Concentration de l'actine F, 1 mg/ml; concentration de la pronase, 0.1 mg/ml; protection par les Amanites: ○, *A. virosa*; ▽, *A. citrina*; □, *A. spp*; ■, sans extrait

7- Fluorescence de l'*A. citrina*

Les résultats inattendus recueillis pour l'*A. citrina*, nous ont poussé à vérifier si l'extrait de ce champignon possédait des propriétés de fluorescence pouvant interférer avec le changement de la fluorescence de l'actine. A la figure 15, nous avons le spectre d'excitation et d'émission de l'extrait no 18 d'*A. citrina*. Nous avons un maximum d'excitation de 306 nm, donc pas très loin de notre longueur d'onde expérimentale d'excitation de 294 nm. Le maximum d'émission se situe à 338 nm, donc directement entre le spectre d'émission de l'actine non dégradée et l'actine dégradée, soit respectivement 327 et 353 nm. On voit donc que, contrairement à l'extrait d'*A. virosa* qui ne manifeste aucune fluorescence dans cette région du spectre, l'*A. citrina* a une fluorescence importante qui interfère avec la fluorescence aussi bien de l'actine native que de l'actine protéolysée. Il devenait donc difficile de juger de l'effet de l'*A. citrina* sur l'actine par fluorimétrie.

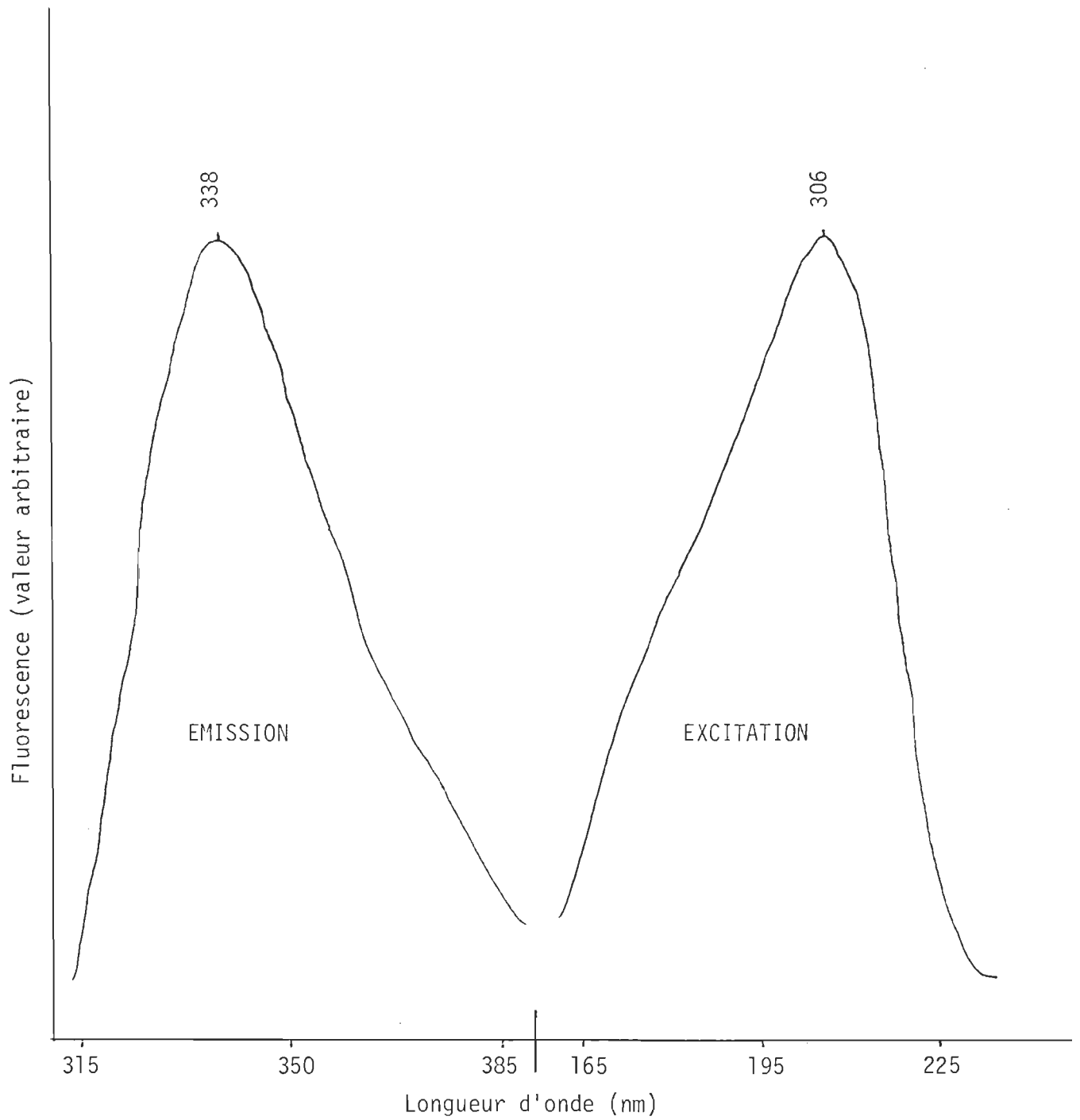


Figure 15 - Spectre d'émission et d'excitation de fluorescence de l'extrait no 18 d'*A. citrina*

8- Etude par viscosimétrie de l'*A. citrina*

Nous avons donc étudié cet effet par viscosimétrie (55). Nous avons à la figure 16 l'effet de l'extrait d'*A. citrina* à différentes concentrations sur la protéolyse de l'actine F par la pronase et mesuré par viscosimétrie. La viscosité est représentée en pourcentage et le temps en minutes. On peut s'apercevoir que les extraits d'*A. citrina* démontrent également par cette méthode un effet protecteur de l'actine contre l'action de la pronase. Néanmoins cet effet est assez faible en comparaison à celui de l'*A. virosa*. Nos travaux se sont concentrés par la suite sur ce dernier champignon.

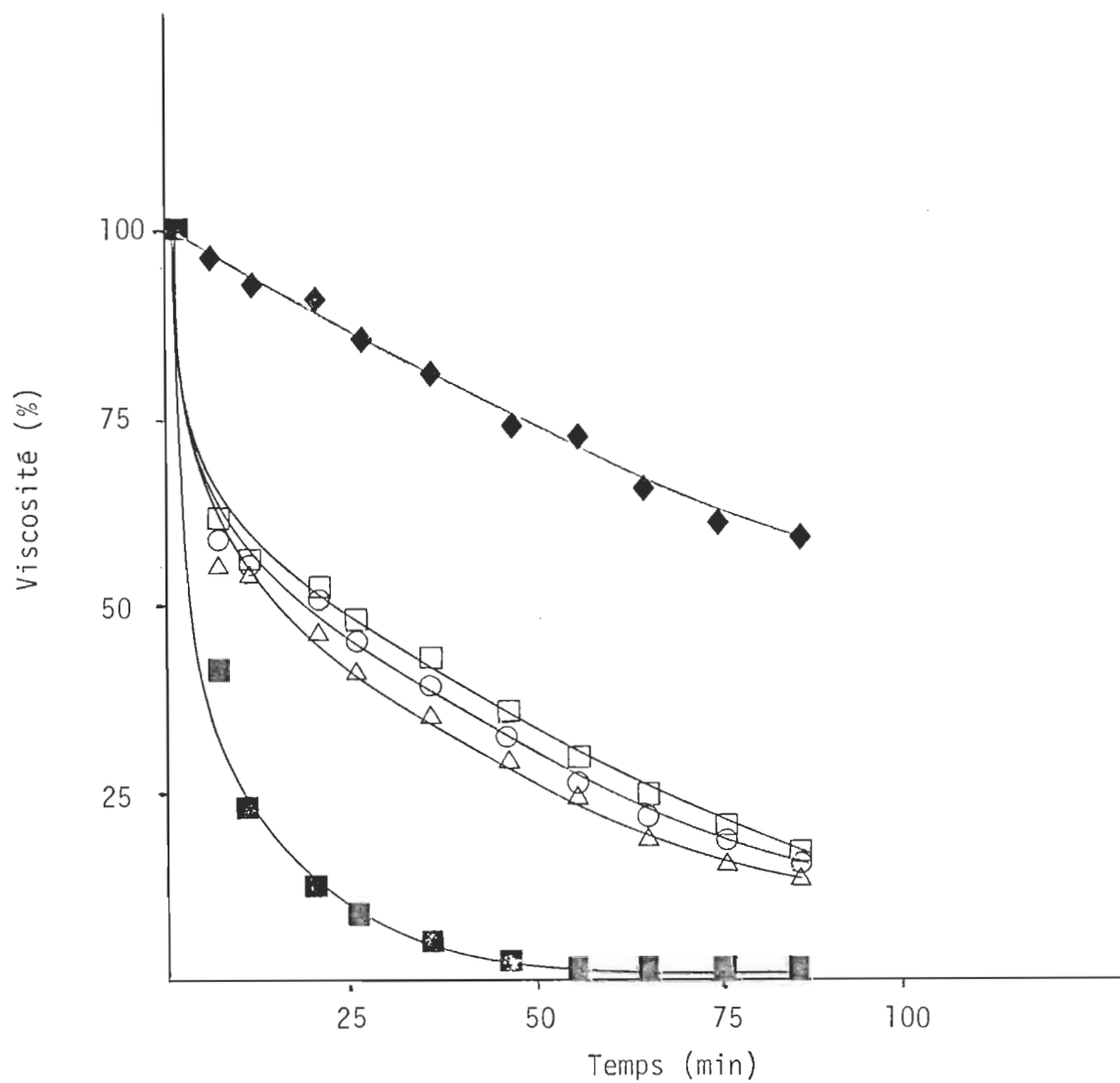


Figure 16 - Effet de l'extrait no 18 d'*A. citrina* sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par viscosimétrie. Concentration de l'actine F, 1 mg/ml; concentration de la pronase, 0.1 mg/ml. Les concentrations d'*A. citrina* sont exprimées en termes de dilution de l'extrait: □, 1:1; ○, 1:2; △, 1:5; ■, sans *A. citrina*; ◆, *A. virosa* 1:5.

9- Méthode de dosage

Nous avons décidé de doser la quantité globale d'activité dans l'*A. virosa*. A partir de la formule de la masse équivalente de phalloïdine (Fig. 11), nous avons analysé la quantité de toxines contenues dans nos cinq extraits d'*A. virosa* et qui ont un effet sur l'actine. Comme nous l'avons mentionné dans Les Méthodes, cette étude est basée sur la protection de l'actine contre la pronase et mesurée par spectrofluorimétrie.

Au départ, nous devions choisir une concentration d'extrait d'*A. virosa* dont le $T_{1/2}$ était ni trop long pour ne pas éterniser l'étude et ni trop court pour qu'il y ait une différence significative avec le $T_{1/2}$ de l'actine sans protection. L'étude fluorimétrique nous a démontré que la dilution 1:5 était la plus intéressante en ce qui concerne nos extraits d'*A. virosa*. Aux figures 17 et 18, nous avons suivi par fluorimétrie l'effet de nos cinq extraits d'*A. virosa*. Nous nous sommes référés à trois concentrations différentes de phalloïdine et à l'actine sans protection. Etant donné la complexité des résultats expérimentaux, nous avons rassemblé les données au tableau 9. Nous retrouvons dans ce tableau l'activité (masse équivalente de phalloïdine par gramme de champignon sec) pour les cinq extraits d'*A. virosa*; ces masses sont déduites des graphiques représentés sur les figures 17 et 18, en appliquant la formule de la figure 11.

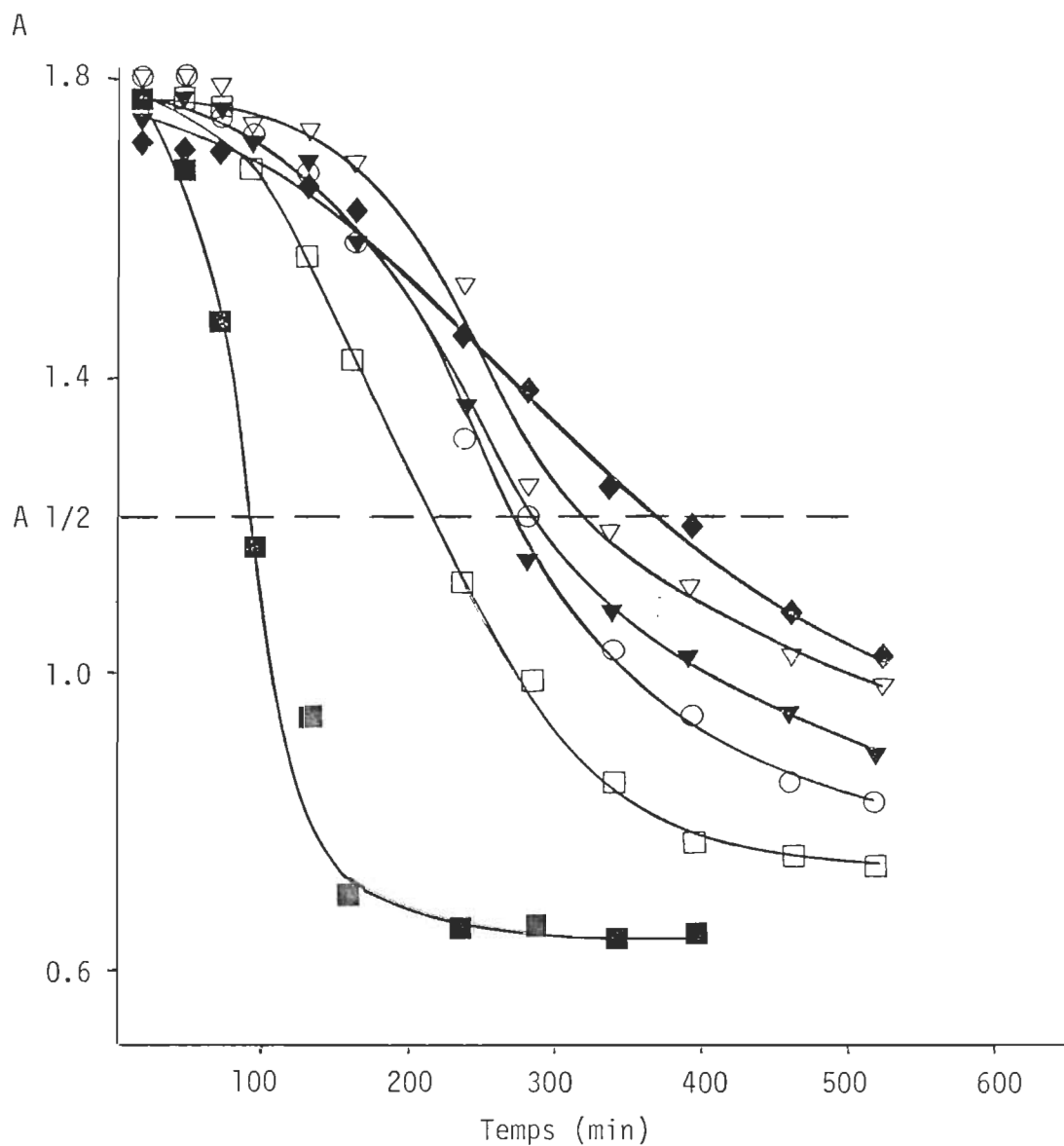


Figure 17 - Effet des extraits no 1 et 3 d'*A. virosa* sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par fluorimétrie. Concentration de l'actine F, 1 mg/ml; concentration de la pronase, 0.1 mg/ml; dilution des extraits et de la phalloïdine: ∇ , 1:2.5 de phalloïdine; \circ , 1:5 de phalloïdine; \square , 1:10 de phalloïdine; \blacktriangledown , 1:5 de l'extrait no 1; \blacklozenge , 1:5 de l'extrait no 3; \blacksquare , sans toxine

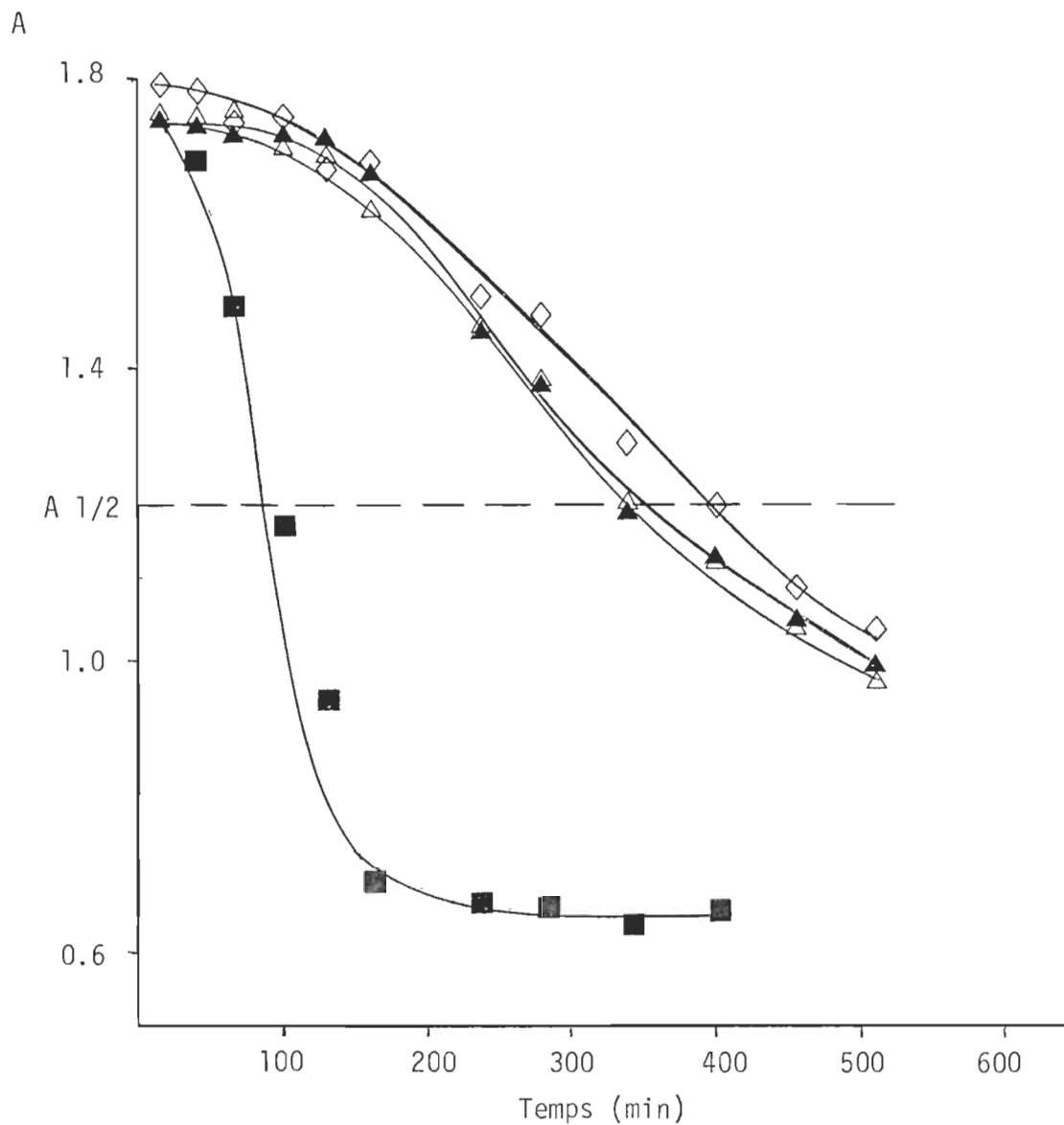


Figure 18 - Effet des extraits no 5, 7 et 9 d'*A. virosa* sur la protéolyse de l'actine F par la pronase, suivi par fluorimétrie. Concentration de la pronase, 0.1 mg/ml; concentration de l'actine F, 1 mg/ml; dilution des extraits: Δ , 1:5 de l'extrait no 5; \blacktriangle , 1:5 de l'extrait no 7; \diamond , 1:5 de l'extrait no 9; \blacksquare , sans extrait

TABLEAU 9

Activité de cinq extraits d'*A. virosa*

Echantillon	Extrait d' <i>A. virosa</i>	Dilution de phalloïdine*	T $\frac{1}{2}$	Activité
	(no)		(min)	(mg eq.phal./ g de champ. sec)
1	—		85	—
2	—	1:2.5	335	—
3	—	1:5	275	—
4	—	1:10	205	—
5	1	—	280	7.07
6	3	—	355	12.29
7	5	—	335	12.82
8	7	—	350	15.13
9	9	—	400	12.92

* Dilution de phalloïdine à partir d'une concentration de 2 mg de phalloïdine/ ml d'eau

10- Séparation par chromatographie sur colonne et spectre d'élution de l'extrait no 9 d'*A. virosa*

Nous avons fractionné les cinq extraits d'*A. virosa* sur Sephadex LH-20. Les différentes fractions ont été analysées et leur activité déterminée. Ces extraits ont tous donné un profil d'élution semblable mais nous citons comme exemple l'extrait no 9 (Fig. 19). Les premiers 750 ml d'élution contiennent des substances colorées et non actives.

Entre 750 et 875 ml, nous avons un épaulement A et un pic B important. Entre 900 et 1000 ml, nous voyons les pics C et D et, finalement, entre 1025 et 1100 nous remarquons un pic E important. Les fractions contenant l'épaulement A et le pic B ont été séparées une seconde fois, mais cette fois en circuit fermé pendant six jours, à raison de 0.05 ml/min. A la figure 20, nous avons le profil d'élution où l'on peut voir les pics A et B séparés.

Nous avons vérifié l'activité de ces cinq fractions (Tableau 10). Les fractions A, B et E se sont montrées très actives pour protéger l'actine contre la protéolyse de la pronase; tandis que les fractions C et D n'ont démontré aucune activité. Les résultats des analyses effectuées par le laboratoire du Docteur Théodor Wieland (Tableau 10) ont démontré que les fractions A et B étaient des virotoxines, les fractions C et D des nucléotides et la fraction E, de la phalloïdine. L'activité totale des cinq fractions équivaut à 10.8 mg eq. phalloïdine/ g de champignon sec. Quant à l'extrait brut, il donnait une activité de 12.92 mg eq. phall./ g de champignon sec. Les pertes dues à la séparation sur colonne équivalaient donc à environ 15 à 20%.

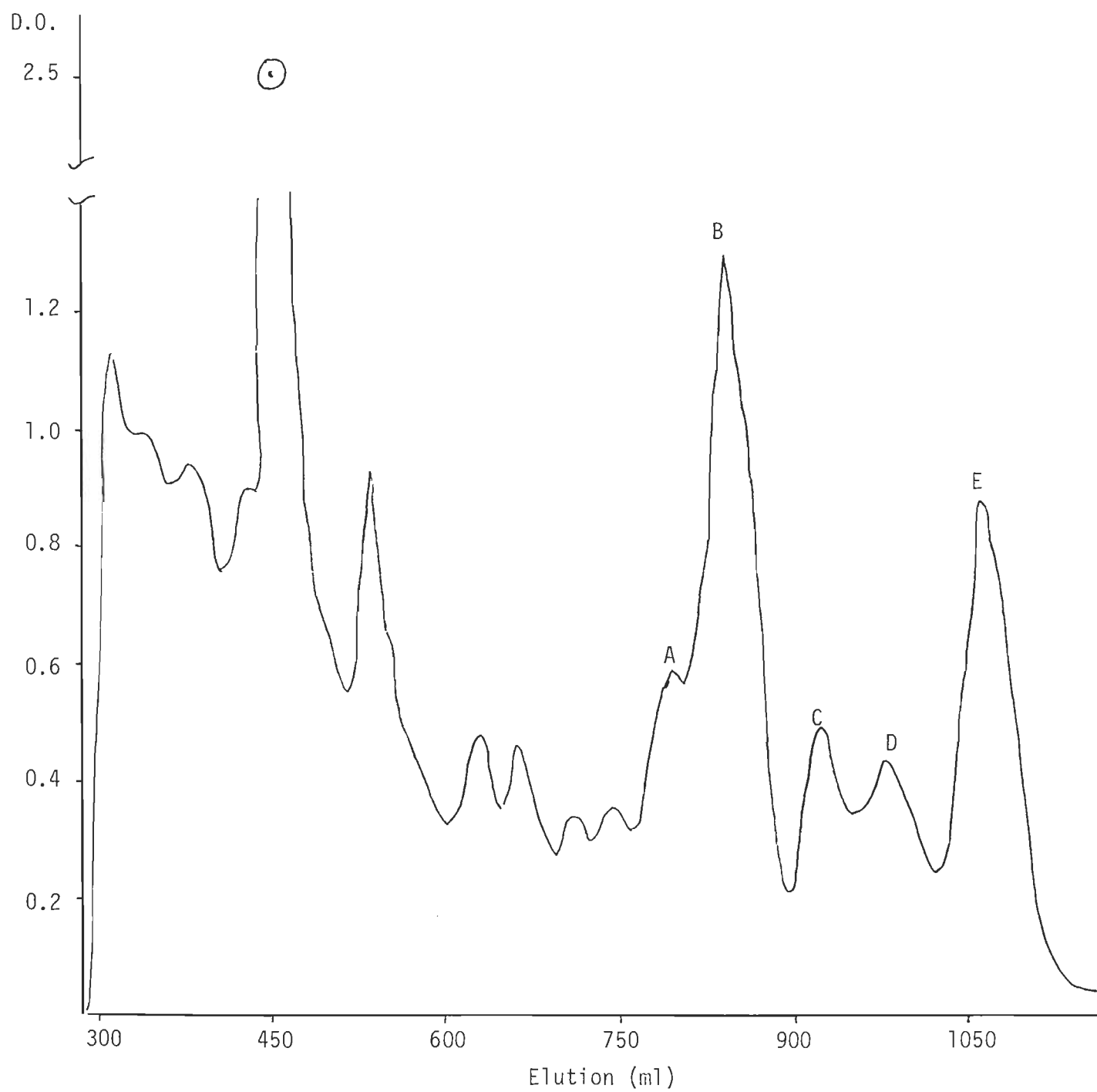


Figure 19 - Spectre d'élution de l'extrait no 9 d'*A. virosa*

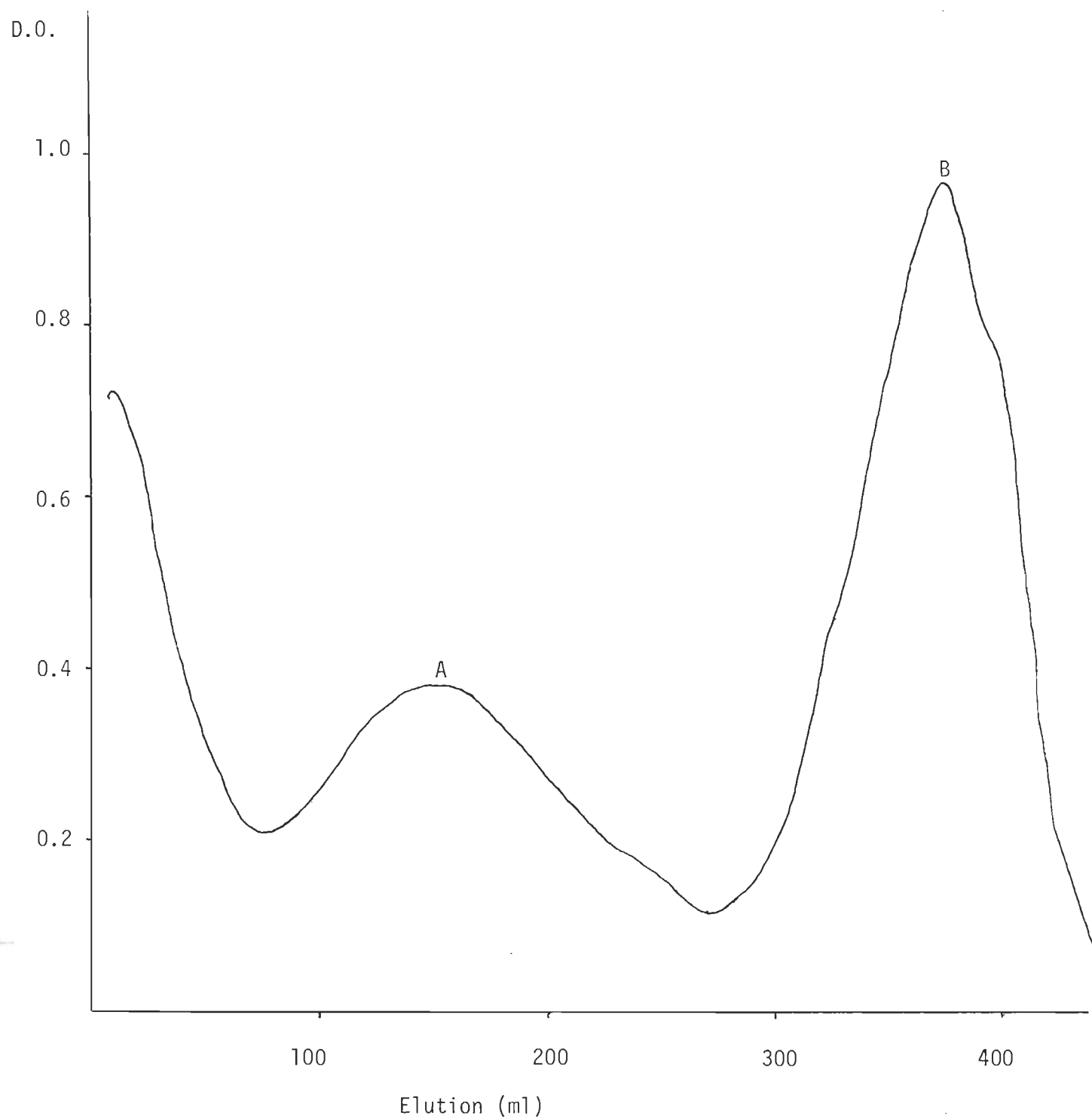


Figure 20 - Spectre d'élution des fractions A et B de l'extrait no 9 d'*A. virosa*

TABLEAU 10

Activité des cinq fractions de l'extrait no 9 d'*A. virosa*

Fraction	Activité	Nature des fractions
	(mg eq.de phal./g de cham. sec)	
A	2.8	forme(s) de virotoxine(s)
B	3.8	forme(s) de virotoxine(s)
C	0	nucléotide non déterminée
D	0	nucléotide non déterminée
E	4.2	phalloïdine

11- Séparation par chromatographie sur colonne et spectre d'élution de l'extrait no 18 d'*A. citrina*

Nous pouvons maintenant procéder à la séparation par chromatographie sur colonne de l'*A. citrina* puisque nous détenons à présent un point de comparaison. Nous voyons à la figure 21 le spectre d'élution en ultraviolet de notre extrait. Comme on peut le remarquer, le volume entre 700 et 1100 ml qui nous intéressait pour l'*A. virosa*, semble pour l'*A. citrina*, contenir que des substances colorées et non actives. Nous avons un premier pic A entre 1120 et 1300 ml et un second pic B de 1950 à 2400 ml.

La fraction entre 1000 et 1100 ml qui correspondait à la phalloïdine dans l'*A. virosa*, ne montre ici aucune absorption en ultraviolet. Ensuite, nous avons pris un spectre de densité optique du pic A (Fig. 22) où nous observons un maximum d'absorption à 255 nm et un épaulement à 280 nm. A la figure 23, nous avons un spectre de densité optique pour le pic B; nous observons sur ce spectre un maximum d'absorption à 273 et un épaulement à 292.

Après une vérification de la fluorescence de plusieurs fractions, nous nous sommes aperçus que c'était la fraction B qui contenait la substance fluorescente. Nous n'avons malheureusement pas pu déterminer l'activité protectrice des différentes fractions par manque de matériel après les analyses.

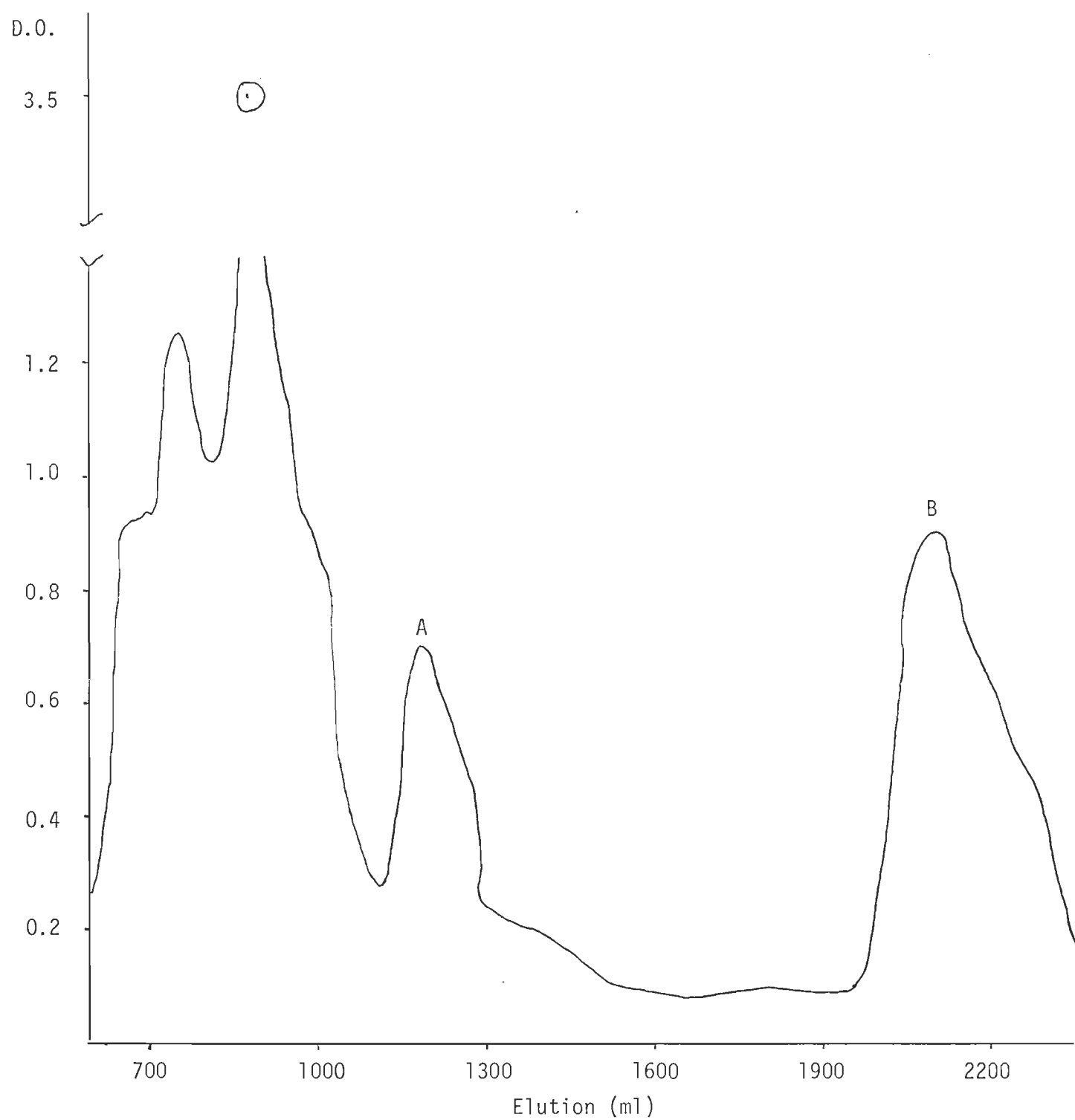


Figure 21 - Spectre d'élution de l'extrait no 18 d'*A. citrina*

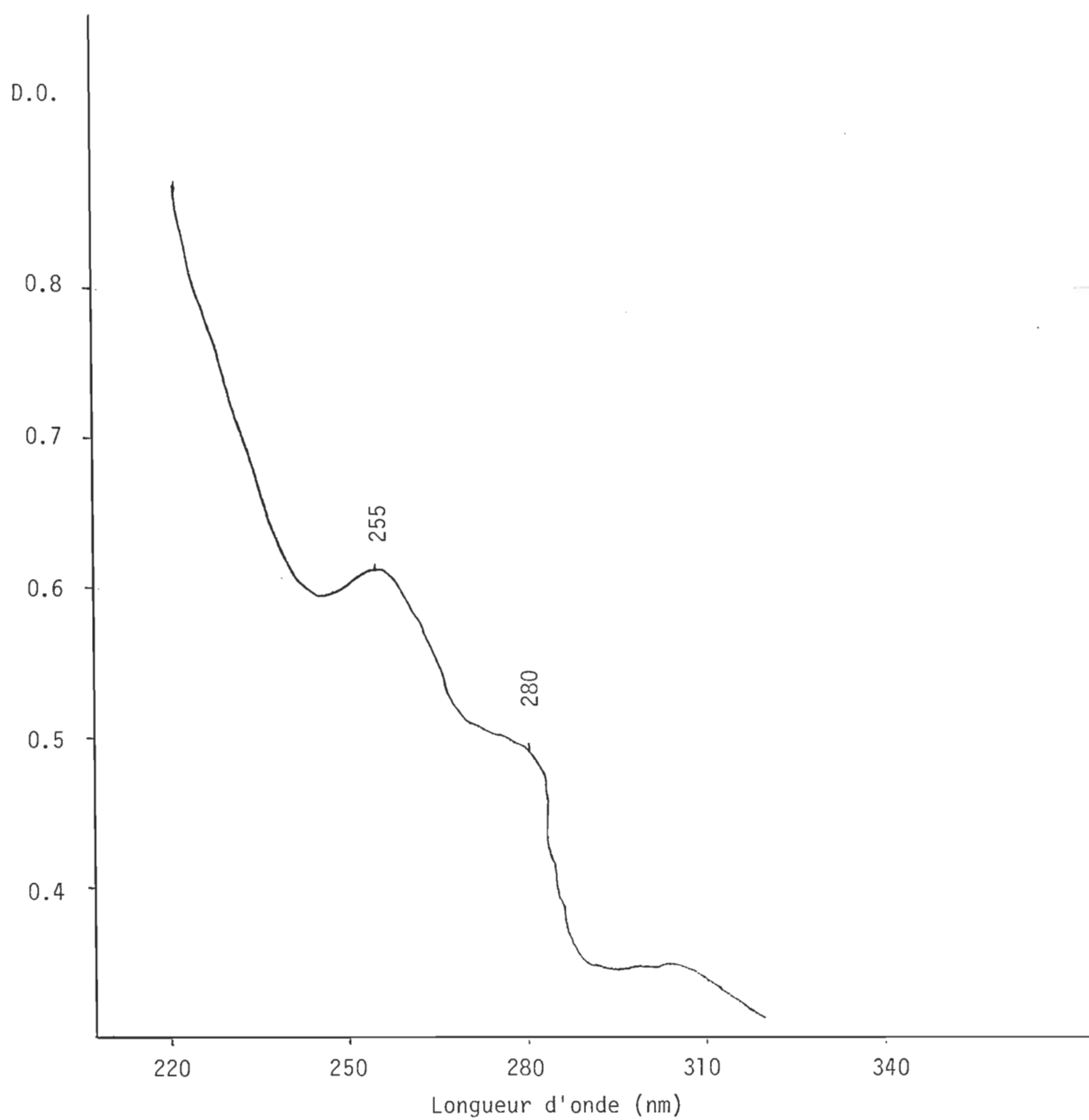


Figure 22 - Spectre de densité optique de la fraction A de l'*A. citrina*

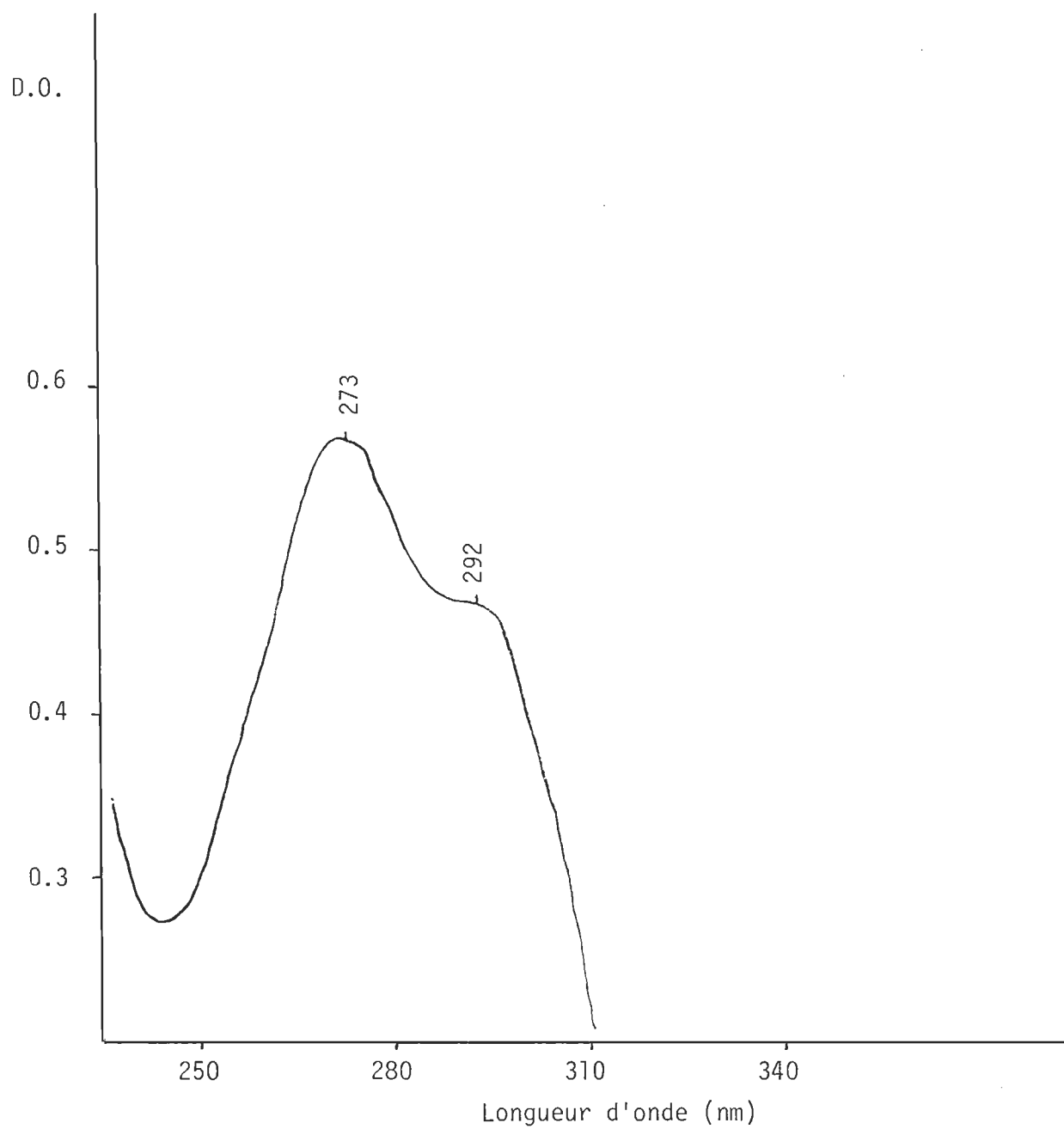


Figure 23 - Spectre de densité optique de la fraction B de l'*A. citrina*

12- Evaluation de l'activité des chapeaux et des pieds des extraits
d'*A. virosa*

Nous avons analysé le contenu en toxines des chapeaux et des pieds de cinq *A. virosa*. Nous avons utilisé encore une fois la méthode de la protection de l'actine F contre la protéolyse par la pronase mesurée par spectrofluorimétrie. A partir des courbes obtenues, nous avons calculé l'activité selon la formule de la figure 11. Au tableau 11 nous avons la masse équivalente de phalloïdine en mg / g de champignon sec et cela pour chacune des parties du champignon. On remarque que le chapeau contient approximativement deux fois plus d'activité que le pied.

TABLEAU 11

Activité de différentes parties de cinq champignons *A. virosa*

Parties du champignon	Poids sec	Volume final	Activité
	(g)	(ml)	(mg éq. phal./ g de champ. sec)
Chapeau (1)	2.06	12	11.04
Pied (1)	1.71	11.5	6.47
Chapeau (2)	1.64	10.8	13.61
Pied (2)	1.54	10.4	6.97
Chapeau (3)	1.71	11.5	13.45
Pied (3)	2.29	11.7	4.51
Chapeau (4)	1.31	10.9	16.04
Pied (4)	0.89	10.9	7.50
Chapeau (5)	1.23	10.8	15.12
Pied (5)	1.23	10.9	7.06

DISCUSSION

Des 24 espèces du genre *Amanita* possiblement présentes au Québec, nous avons trouvé seulement huit espèces qui sont d'ailleurs les plus fréquentes(56). L'identification des espèces ne fait aucun doute grâce à la confirmation du spécialiste en la matière Docteur René Pomerleau. En visitant plusieurs autres régions du Québec, nous aurions peut-être pu retracer une plus grande variété d'espèces; mais du point de vue pratique et financier, il nous a fallu se limiter principalement au parc national de la Mauricie. Nous avons toutefois exploré d'autres secteurs de la région mais nous n'avons trouvé que très peu d'Amanites de même espèce que celles déjà cueillies. L'exploration des bois a débuté à la fin du printemps 1978, mais nous n'avons trouvé les champignons qui nous intéressaient qu'au milieu de juillet.

De ces huit espèces, trois seulement ont entraîné la mort des souris: l'*A. rubescens*, l'*A. muscaria* et l'*A. virosa*. L'*A. rubescens* et l'*A. muscaria* ont tué les souris en moins de 45 minutes, contrairement à l'*A. virosa* qui agissait seulement après plusieurs heures. L'*A. rubescens* est un cas intéressant du fait qu'elle est considérée comme un excellent champignon comestible. Cependant la mort causée par injection intrapéritonéale de cet extrait de champignon, n'indique pas nécessairement un risque d'intoxication par ingestion buccale. La phallolysine, par exemple, substance hémolytique extraite de l'*A. phalloïdes* (60,61), tue rapidement les souris par injection intrapéritonéale mais ne les affecte pas du tout par ingestion buccale (72). Certains auteurs (13) parlent de la présence d'amatoxines en quantités importantes dans l'*A. rubescens*, mais l'effet mortel de ces toxines se produit entre 2 à 5 jours, ce qui les met hors de cause dans notre cas. D'autres auteurs (75) mentionnent la présence de phallotoxines ce qui pourrait aussi être un facteur de mortalité, mais nous n'avons trouvé aucune trace de ces toxines par notre méthode basée sur la protection de l'actine par les phallotoxines. A partir de cette méthode, on peut facilement observer des concentrations en phallotoxines jusqu'à 0.01 mg/ml. Et dans la littérature (72), on peut lire que la mort des souris ne survient que de 1 à 2 heures après l'intoxication par de grandes quantités de phallotoxines. Donc il est impossible que la mort des souris soit due aux phallotoxines. Il existe probablement une autre classe de substances causant rapidement la

mort des souris après injection intrapéritonéale. Ces substances pourraient avoir, par exemple, un effet semblable à celui de la phallolysine. Il serait intéressant de continuer des recherches dans cette voie.

L'*A. muscaria*, quant à elle, est très connue pour ses propriétés hallucinogènes (40). Vu le comportement assez exceptionnel des souris, nous sommes portés à croire qu'elles étaient sous l'effet de drogues hallucinogènes puissantes. De plus, ce champignon contient de la muscarine, qui serait peut-être assez concentrée dans nos extraits pour avoir un effet sur les souris. Les mêmes auteurs (13), qui parlaient d'amatoxines dans l'*A. rubescens*, mentionnent leurs présences dans l'*A. muscaria*. Mais encore une fois, le temps d'action de ces toxines les élimine comme cause de mortalité.

Comme on pouvait s'y attendre, l'extrait d'*A. virosa* s'est montré très toxique, même pour des dilutions de 0.100. Dans la littérature (72) on cite la DL_{50} en termes de mg de toxines pures par kg (souris), tandis que nous nous travaillons en mg de champignon sec par kg (souris) à cause du fait qu'on a pas isolé les toxines à l'état pur. Il nous est toutefois possible de faire certaines comparaisons. Wieland (74) mentionne qu'il y a environ 10 mg de phalloïdine par 5 g de tissus secs pour l'*A. phalloïdes*. Toutefois toujours selon Wieland et Faulstich (1978) (72), la phalloïdine a un DL_{50} de 2.5 mg/kg (souris). En partant de ces deux valeurs, on obtient un DL_{50} de 1250 mg de champignons secs par kg (souris). Notre DL_{50} était de 260 mg de champignons secs par kg (sou-

ris), donc notre champignon serait cinq fois plus toxique. Nous pouvons facilement soutenir de telles comparaisons étant donné que nos échantillons d'*A. virosa* ne contenaient pas d'amatoxines. Nos champignons contiennent cependant des virotoxines, mais leur DL_{50} est aussi de 2.5 mg de toxines pures/kg (souris) (12); ce qui ne contredit pas l'hypothèse.

Il a été mentionné que l'espèce *A. brunnescens* serait mortelle et pourrait être une variété américaine de l'*A. phalloides* (57); mais comme aucune des souris intoxiquées par ce champignon n'est morte, le lien de parenté se limiterait peut-être à l'aspect botanique de l'espèce.

N'ayant pu nous servir d'une manière satisfaisante de la HPLC, nous sommes retournés vers la traditionnelle chromatographie sur colonne. Nos cinq échantillons d'*A. virosa* nous ont donné chacun cinq pics d'élu-tion avec un profil semblable. Nous avons obtenu de nos extractions un mélange de virotoxines, des nucléotides et de la phalloïdine. Contraire-ment aux données de certains autres auteurs (13,50,75), aucun de nos é-chantillons ne contenait d'amatoxines. Nous ne pouvons extrapoler à par-tir d'un si faible échantillonnage, mais ces résultats sont tout de même très intéressants. Si dans un échantillonnage plus représentatif, on s'apercevait que les amatoxines sont toujours absentes de l'*A. virosa*, une étude plus approfondie de ce champignon serait d'un très grand inté-rêt. Cependant une telle étude demanderait une technique beaucoup plus rapide que la chromatographie sur colonne. La HPLC serait toute désignée pour de telles recherches.

Le cas de l'*A. citrina* s'est avéré des plus intéressants. En tout premier lieu, ce champignon montrait une protection de l'actine par fluorimétrie, mais on a démontré que cet extrait émettait de la fluorescence dans l'intervalle de fluorescence de l'actine. Dans le but de s'assurer que ce champignon n'avait pas d'effet sur l'actine, nous avons vérifié par viscosimétrie cette protection. Mais encore une fois, l'actine était protégée dans une certaine mesure. La première idée qui nous est venue est que ce champignon contient peut-être une ou des phallotoxines ou bien des virotoxines, mais en quantités insuffisantes pour tuer les souris; peut-être aussi que ces toxines ne peuvent pénétrer dans les cellules du foie ou bien est-ce une nouvelle substance spécifique à l'*A. citrina* qui aurait un effet protecteur de l'actine, mais qui ne serait pas toxique in vivo.

Nous avons donc décidé de séparer cet extrait par chromatographie sur colonne et de comparer son spectre d'élution avec celui de l'*A. virosa*. Les volumes qui nous intéressaient dans le cas de l'*A. virosa* correspondaient aux éluats colorés pour l'*A. citrina*. Nous avons vérifié par spectrophotométrie la fraction du volume qui correspondait au pic A. Le pic A nous a donné un spectre de densité optique (Fig. 22) très clair avec un maximum de 255 nm, ce qui correspond aux nucléotides. Le pic B est le plus intéressant parce qu'il contient la substance fluorescente, mais aussi parce qu'il montre un spectre avec un épaulement à 290 nm et un maximum d'absorption optique à 273 nm (Fig. 23). Cet épaulement à 290 nm correspond à la même valeur que le maximum d'absorption pour les phallotoxines.

Si nous sommes en présence de phallotoxines, il faut se demander pour quelles raisons elles sont éluées avec le double du volume, comparativement à celles de l'*A. virosa*. Peut-être que ces phallotoxines sont liées d'une certaine façon à un composé très polaire et/ou très encombrant, étant ainsi retenues plus longtemps sur la colonne de Sephadex LH-20. Ce composé serait peut-être en cause dans la non-pénétration dans les cellules du foie des souris; peut-être aussi que les phallotoxines ne sont pas en quantités suffisantes pour tuer les souris. Nous n'avons pas vérifié s'il avait protection de l'actine par la fraction B contre la pronase, parce que nous avons malheureusement manqué de matériel.

N'ayant pu établir une méthode de dosage quantitative par HPLC, nous nous sommes servis d'une méthode de dosage semi-quantitative mise au point par notre laboratoire. Cette méthode est représentée par la formule de la figure 11. Nous nous sommes servis de trois dilutions de phalloïdine dont la concentration initiale était de 2 mg/ml (Fig. 11) dans le but de vérifier la validité de cette formule. De cette formule, nous avons éliminé les valeurs du poids du champignon et du volume d'extraction qui sont inutiles dans ce cas-ci. A partir de la courbe 2, on obtient une concentration de 3.04 mg/ml pour la courbe 3 et 1.58 pour la courbe 4. Ceci représente 52% d'erreur dans le premier cas et 21% dans le second par rapport à la concentration initiale de 2mg/ml. Mais si on fait la moyenne des deux concentrations obtenues, on a maintenant une con-

centration de 2.31 mg/ml soit 15% d'erreur. Après vérification de plusieurs autres courbes semblables dont nous nous sommes servis dans toutes nos expérimentations, nous avons obtenu des résultats tout en dessous de 10% d'erreur à l'exception du cas précédent.

Donc cette formule pourrait nous donner d'assez bons résultats, si on tient compte des conditions suivantes: les courbes de référence doivent non seulement être très rapprochées, mais aussi on doit en avoir une de chaque côté de la courbe inconnue pour faire la moyenne des deux résultats. Un autre point important, c'est le temps de demi-vie; si la protection de l'actine est trop longue, la courbe devient très évasée et, par conséquence, le $T_{1/2}$ est très difficile à déterminer avec précision. Donc que ce soit pour les courbes de référence ou les inconnues, on devrait travailler avec plusieurs dilutions pour essayer d'obtenir un $T_{1/2}$ d'environ 4 à 5 heures. Dans le cas où nous obtenons 15.5% d'erreur, nos $T_{1/2}$ sont très éloignés contrairement aux autres expériences, ce qui expliquerait cette différence.

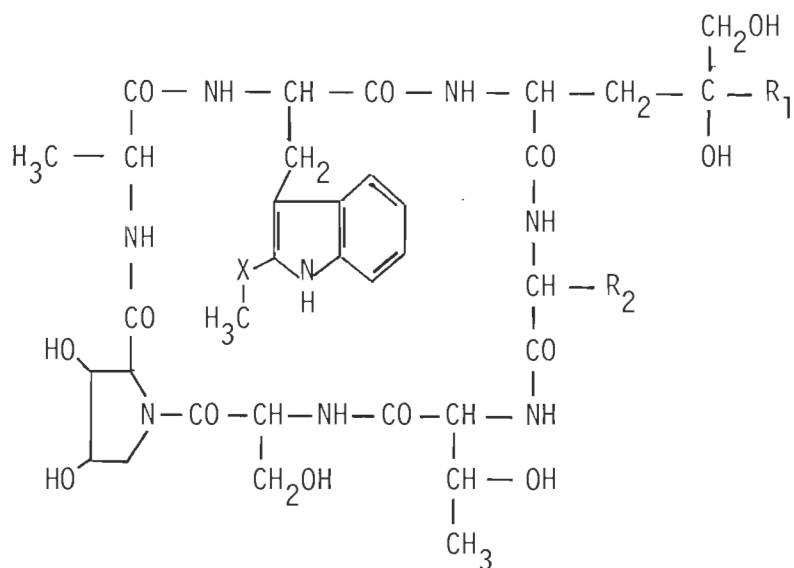
Etant donné que nous travaillons beaucoup dans notre laboratoire avec la phalloïdine et de plus en plus avec les virotoxines, il nous faut extraire massivement ces toxines. Nous avons donc divisé notre champignon en deux parties, le chapeau et le pied, pour en extraire séparément leurs toxines. Si on regarde les résultats du tableau 11, on s'aperçoit que pour les cinq champignons, le chapeau contient plus du double de toxines. On remarque aussi que les chapeaux les plus légers contiennent

plus de toxines par gramme que les lourds. Les pieds, en plus de contenir peu de toxines, sont très difficiles à broyer finement. Il y a seulement Courtillot et Staron (1970) (6) de France qui ont aussi fait ce genre d'études. Ils ont obtenu de l'*A. virosa* 1.35 mg de toxines/g de tissus secs pour le chapeau et 1.15 mg pour le pied. La différence entre les deux parties est loin d'être aussi significative que dans notre cas. D'après nos résultats, pour des préparations de toxines, on devrait utiliser surtout les chapeaux.

Il y a un travail récent de Faulstich *et al* (1981) (12) sur le champignon *A. virosa* qui nous est parvenu en 1982, soit après la fin de la partie expérimentale de cette maîtrise. Ces auteurs ont étudié des Amanites cueillies en Virginie aux Etats-Unis. Ces études récentes nous donnent une bonne base supplémentaire de comparaison, principalement en ce qui a trait à la toxicité des champignons et à leur contenu en toxines. Ces auteurs (12) mentionnent que les amatoxines et/ou les phallotoxines ne sont pas toujours présentes dans l'*A. virosa* mais que les virotoxines le sont toujours. Nous n'avons pas obtenu d'amatoxines dans nos champignons, mais par contre nous avons toujours des deux autres groupes de toxines. Faulstich *et al* ont obtenu six virotoxines, dont quatre à l'état pur. La purification et la résolution de ces virotoxines ont d'ailleurs été réalisées par chromatographie en phase liquide à haute pression et cela, après une première séparation par chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20. Donc une séparation directe de l'extrait brut

semble très peu probable. La purification des virotoxines par chromatographie en phase liquide à haute pression a été faite sur une colonne Zordax ODS de dimension 200X9 mm avec, comme éluant, un gradient linéaire d'acétonitrile/eau. En ce qui nous concerne, nous avons utilisé une colonne μ Bondapark C₁₈ de dimension 300X3.9 mm avec le même éluant que Faulstich. Nous avons des conditions expérimentales semblables sans toutefois obtenir une bonne séparation des toxines provenant du laboratoire de Wieland. Donc il est évident que les toxines de Wieland n'étaient tout simplement pas pures.

Nous avons à la figure 24 la formule générale de la structure des virotoxines avec les différents groupements pour chacune des toxines. Ce qu'on retient de cette formule, c'est sa structure monocyclique. Des virotoxines ont montré la même toxicité envers les souris et la même activité envers l'actine que dans le cas des phallotoxines. Cette toxicité est surprenante compte tenu du fait que tous les dérivés monocycliques des phallotoxines perdent entièrement aussi bien leur toxicité (Tableau 2) que leur effet protecteur sur l'actine F (Tableau 1).



	X	R ₁	R ₂
VIROIDINE	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
DESOXO-VIROIDINE	SO	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
ALA-VIROIDINE	SO ₂	CH ₃	CH ₃
ALA-DESOXO-VIROIDINE	SO	CH ₃	CH ₃
VIROISINE	SO ₂	CH ₂ OH	CH(CH ₃) ₂
DESOXO-VIROISINE	SO	CH ₂ OH	CH(CH ₃) ₂

Figure 24 - Structure cyclique des virotoxines. Caractères différentiels entre les toxines, (d'après Faulstich *et al.*, 1981)

VI

CONCLUSION

En tout premier lieu, il faut se rappeler que cette maîtrise fait partie du cadre des sciences de l'environnement. Ce qui nous rattachait à ce domaine, c'étaient les dangers d'intoxication au sein de la population par ces champignons. L'*A. virosa* est très fréquente dans notre région et, principalement, en bordure des sentiers pédestres du parc national de la Mauricie. On peut donc s'imaginer les dangers encourus par des gens inexpérimentés à la cueillette de champignons et surtout dans un endroit aussi fréquenté. Même si les règlements stipulent que tout genre de cueillette est interdite, il se trouve toujours quelqu'un qui passe outre ces indications, sans toutefois en connaître les conséquences. D'ailleurs, quoi de plus attirant qu'un beau champignon d'un blanc pur, sans parasite et sans ver et si ressemblant au champignon commercial (Agarique des prés), même s'il est mortel.

Plusieurs questions se sont posées au cours de cette maîtrise, et de très peu on eut de réponses finales, du moins. Par exemple, quelles substances entraînent la mort des souris chez l'*A. rubescens* et l'*A. muscaria* et quels systèmes sont attaqués. Il serait aussi très intéressant de vérifier dans un échantillonnage plus représentatif si les amatoxines sont toujours absentes dans l'*A. virosa* du Québec; surtout si on regarde et compare les derniers résultats de Faulstich *et al* (1981) (12). Cependant c'est le champignon *A. citrina* qui nous a le plus surpris, nous laissant dans le doute complet. Comme on a pu le lire dans la discussion, nous nous sommes interrogés longuement sur ce sujet.

L'ensemble des objectifs que nous nous étions fixés a été atteint. Seule la séparation des toxines n'a pas été réalisée comme nous le désirions. Mais si les toxines obtenues de Wieland avaient été pures, nous aurions certainement eu de meilleurs résultats; et, par le fait même, nous aurions mis au point une méthode de dosage sélective et rapide des différentes toxines.

Habituellement un travail de maîtrise n'est qu'une ouverture vers d'autres projets de recherches. Dans le cas présent, ce ne serait pas le manque de sujets qui nous ferait défaut. En ce qui me concerne, l'*A. citrina* est le sujet qui retient le plus mon attention. Dans un autre domaine d'idées, il serait urgent de mettre sur pied un bon système de renseignements en ce qui a trait aux dangers d'intoxication par les champignons; le tout pourrait commencer par les journaux et médias d'information ainsi que les kiosques de renseignements gouvernementaux.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Agostini, B., Govindan, V.M., Hofmann, W. (1975a). Morphological changes induced by phalloidin in the rat liver. Pathog. Mech. Liver Cell. Necrosis [Workshop Exp. Liver Inj.] 4th, 1974, chap. 16: 175-192.
- 2 - Agostini, B., Govindan, V.M., Hofmann, W., Wieland, Th. (1975b). Phalloidin-induced proliferation of actin filaments within rat hepatocytes. Z. Naturforsch 30: 793-795.
- 3 - Buku, A., Campadelli-Fiume, G., Fiume, L., Wieland, Th. (1971). Inhibitory effect of naturally occurring and chemically modified amatoxins on RNA polymerase of rat liver nuclei. FEBS Lett., 14: 42-44.
- 4 - Cochet-Meilhac, M., Chambon, P. (1974). Mechanism of the inhibition of RNA polymerases B by amatoxins. Biochim. Biophys. Acta, 353: 160-184.
- 5 - Congote, L.F., Solomon, S. (1974). Studies on the inhibition of RNA synthesis by phalloidin in primary cultures of fetal cells. Biochim. Biophys. Acta, 366: 79-88.
- 6 - Courtillot, M., Staron, T. (1970). *Amanita virosa* Fr. précisions sur l'espèce, mise en évidence de sa toxine principale. Ann. Phytopathol., 2: 561-584.
- 7 - Danker, P., Löw, I., Hasselback, W., Wieland, Th. (1975). Interaction of actin with phalloidin: polymerisation and stabilization of F-actin. Biochim. Biophys. Acta, 400: 407-414.
- 8 - Daum, R.J. (1969). Log. probit (percent response computed) analysis maximum likelihood. Bulletin of the entomology society of America, 16: 10-15.

- 9 - De Vries, J.X., Schaefer, A.J., Faulstich, H., Wieland, Th. (1976). Protection of actin from heat denaturation by various phallotoxins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357: 1139-1143.
- 10 - Dolara, P., Franconi, F., Manghi, N. (1977). The effect of phalloidin on natural and U.V. denatured bovine serum albumin. Pharmacol. Res. Commun., 9: 339-347.
- 11 - Engel, J., Fasold, H., Hulla, F.W., Waechter, F., Wegner, A. (1977). The polymerization reaction of muscle actine. Molecular and Cellular Biochem., 18: 3-13.
- 12 - Faulstich, H., Buku, A., Bodenmuller, H., Wieland, Th. (1981). Virotoxins, actin-binding cyclic peptides of *Amanita virosa* mushrooms. Biochem., 19: 3334-3343.
- 13 - Faulstich, H., Cochet-Meilhac, M. (1976). Amatoxins in edible mushrooms. FEBS Lett., 64: 73-75.
- 14 - Faulstich, H., Georgopoulos, D., Bloching, M. (1973). Quantitative chromatographic analysis of toxins in single mushrooms of *Amanita phalloides*. J. of Chromatog., 79: 257-265.
- 15 - Faulstich, H., Schäfer, A.J., Weckauf, M. (1977). The dissociation of the phalloidin-actin complex. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358: 181-184.
- 16 - Faulstich, H., Wieland, Th. (1971). Relation of toxicity and conformation of phallotoxins as revealed by optical rotary dispersion studies. Eur. J. Biochem., 22: 79-86.
- 17 - Faulstich, H., Wieland, Th. (1976). Conformation and biological activities of the toxic cyclopeptides of *Amanita phalloides*. Pept: Chem., Struct., Biol., Proc. Am. Pept. Symp., 4th, 1975, 927-933.
- 18 - Faulstich, H., Wieland, Th., Walli, A., Birkmann, K. (1974). Antamanide protects hepatocytes from phalloidin destruction. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355: 1162-1163.
- 19 - Floersheim, G.L. (1971a). Antagonistic effects to phalloidin, α -amanitin and extracts of *Amanita phalloides*. Agents and Actions, 2: 142-149.
- 20 - Floersheim, G.L. (1972). Curative potencies against α -amanitin poisoning by Cytochrome C. Science, 177: 808-809.
- 21 - Floersheim, G.L. (1974). Rifampicin and Cysteamine protect against the mushroom toxin phalloidin. Experientia, 30:1310-1312.

- 22 - Floersheim, G.L. (1975). Treatment of experimental poisoning produced by extracts of *Amanita phalloides*. Toxicol. and applied Pharmacol., 34:499-508.
- 23 - Floersheim, G.L. (1976a). Antagonistic effects against single lethal doses of *Amanita phalloides*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 293: 171-174.
- 24 - Floersheim, G.L. (1976b). Protection by phalloidin against lethal doses of phalloidin. Agents and Actions, 6: 490-492.
- 25 - Floersheim, G.L., Schneeberger, J., Bucher, K. (1971b). Curative potencies of penicillin in experimental *Amanita phalloides* poisoning. Agents and Actions, 2: 138-141.
- 26 - Frimmer, M. (1972). Decrease toxicity of phalloidin in partial hepatectomized rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 272: 447-449.
- 27 - Frimmer, M. (1973a). Release from the phalloidin poisoned rat liver of a cytotoxic principle producing liver cell swelling, potassium release and hemolysis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 276: 187-197.
- 28 - Frimmer, M. (1975). Phalloidin, a membrane specific toxin. Pathog. Mech. Liver Cell Necrosis [Workshop Exp. Liver Inj.], 4th, 1974, chap. 15: 163-173.
- 29 - Frimmer, M. (1977). The role of plasma membranes in hepatotoxic effects. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 297: 15-19.
- 30 - Frimmer, M., Gries, J., Hegner, D., Schnon, B. (1967). Studies of the mechanism of the action of phalloidin. Release of lysosomal enzymes and potassium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 258: 197-214.
- 31 - Frimmer, M., Kroker, R. (1973b). Phalloidin poisoning of isolated hepatocytes: lack of enzyme release. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 279: 99-104.
- 32 - Frimmer, M., Kroker, R., Porstendörfer, J. (1974). The mode of action of phalloidin: demonstration of rapid deformation of isolated hepatocytes by scanning electron microscopy. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 284: 395-398.
- 33 - Frimmer, M., Petzinger, E., Rufeger, U., Veil, L.B. (1977). Trypsin protection of hepatocytes against phalloidin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 300: 163-171.

- 34 - Gaultier, M., Dauchy, F. (1973). L'intoxication phalloïdienne. Connaissances actuelles cliniques pathogéniques et thérapeutiques. J. Eur. Toxicol., 4: 240-242.
- 35 - Govindan, V.M., Faulstich, H., Wieland, Th., Agostini, B., Hasselbach, W. (1972). In-vitro effect of phalloidin on a plasma membrane preparation from rat liver. Naturwissenschaften, 59: 521-522.
- 36 - Govindan, V.M., Rohr, G., Wieland, Th., Agostini, B. (1973). Binding of a phallotoxin to protein filaments of plasma membrane of liver cell. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354: 1159-1161.
- 37 - Govindan, V.M., Wieland, Th. (1975). Isolation and identification of an actin from rat liver. FEBS Lett., 59: 117-119.
- 38 - Gravela, E., Poli, G. (1976). Phalloidin poisoning of isolated hepatocytes: inhibition of protein synthesis. Experientia, 33: 603-604.
- 39 - Gravela, E., Zuretti, M.F., Poli, G. (1975). Early polyribosomal and lysosomal changes in the liver of rats poisoned with *Amanita phalloides* or phalloidin. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 12: 101-110.
- 40 - Heim, R. (1963). Les champignons toxiques et hallucinogènes. Edition Boudée & Cie, Paris.
- 41 - Hennebert, G.L., Mahieu, P., Gilon, L. (1969). Intoxication par l'Amanite phalloïde. Louvain Méd., 88: 739-742.
- 42 - Kroker, R., Frimmer, M. (1974). Decrease of binding sites for phalloidin on the surface of liver cells during carbon tetrachloride intoxication. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 282: 109-111.
- 43 - Kroker, R., Hegner, D. (1973). Solubilization of phalloidin binding sites from rat liver hepatocytes and plasma membranes by trypsin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 279: 339-346.
- 44 - Larcan, A., Lamarche, M., Lambert, H., Laprevote-Heully, M.C., Patrer, J.L. (1975). Recherches expérimentales concernant un traitement de l'intoxication phalloïdienne. Agressologie, 16: 307-318.
- 45 - Lengsfeld, A.M., Löw, I., Wieland, Th., Danker, P., Hasselbach, W. (1974). Interaction of phalloidin with actin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71: 2803-2807.

- 46 - Litten, W. (1975). The most poisonous mushrooms. Sci. Am., 232: 91-101.
- 47 - Löw, I., Danker, P., Wieland, Th. (1976). Stabilization of actin polymer structure by phalloidin: ATPase activity of actin induced by phalloidin at low pH. FEBS Lett., 65: 358-360.
- 48 - Löw, I., Lengseld, A.M., Wieland, Th. (1974). Prevention by aging or by cytochalasin B of phalloidin stimulated formation of micro-filaments in cell membrane preparations of rat liver. Histochem., 38: 253-258.
- 49 - Löw, I., Wieland, Th. (1974). The interaction of phalloidin, some of its derivatives, and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscosimetry. FEBS Lett., 44: 340-343.
- 50 - Malak, S.H.A. (1976). Occurrence of phallotoxins in american collections of *Amanita virosa*. Planta medica, 29: 80-85.
- 51 - Mannherz, H.G., Goody, R.S. (1976). Proteins of contractile systems. Annual Rev. Biochem., 45: 427-465.
- 52 - Morel, J.E. (1975). Un modèle universel de la motilité. La Recherche, 58: 1-5.
- 53 - Moroni, F., Fantozzi, R., Masini, E., Mannaioni, P.F. (1976). A trend in the therapy of *Amanita phalloides* poisoning. Arch. Toxicol., 36: 111-115.
- 54 - Patel, D.J., Tonelli, A.E. (1973). Experimental and calculated conformational characteristics of the bicyclic heptapeptide phalloidin. J. Mol. Biol., 79: 185-196.
- 55 - Pollender, J.M., Gruda, J. (1979). Effect of phalloidin on actin proteolysis as measured by viscometry and fluorimetry. Can. J. Biochem., 57: 49-55.
- 56 - Pomerleau, R. (1966). Les Amanites du Québec. Naturaliste Can., 93: 861-887.
- 57 - Pomerleau, R. (1977). Champignons de l'Est du Canada et des Etats-Unis. Les éditions La Presse Ltée, Montréal.
- 58 - Raaen, H.P. (1968). Improved thin-layer chromatographic separation of *Amanita* toxins on Silica Gel G chromatoplates. J. Chromatog., 38: 403-407.
- 59 - Ruggiero, G. (1973). Enzyme changes during phalloidin poisoning of the isolated rat liver. Isol. Liver Perfusion its Appl., 135-138.

- 60 - Seeger, R., Burkhardt, M., Haupt, M., Feulner, L. (1976). The hemolytic effect of phallolysin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 293: 163-170.
- 61 - Seeger, R., Scharrer, H., Haupt, M. (1973). Phallolysin, a high-molecular-weight toxin from *Amanita phalloides*. Experientia, 29: 829-830.
- 62 - Strocchi, P., Montanaro, N., Dall'alto, R., Novello, F. (1977). Effect of α -amanitin on brain RNA and protein synthesis and on retention of avoidance conditioning. Pharmacol. Biochem. Behav., 36: 111-115.
- 63 - Thévenin, M., Claude, J.R., Truhaut, R. (1976). L'Amanite phalloïde et ses toxines. L'évolution des connaissances sur l'identité des principes toxiques. Eur. J. Toxicol., 9: 197-211.
- 64 - Tuchweber, B., Kovacs, K., Khandekar, J.D., Garg, B.D. (1972). Prevention of phalloidin intoxication in rats by partial hepatectomy. Arch. Toxicol., 29: 311-316.
- 65 - Uebel, H. (1973). Electronia quantification of damage to liver cells detectable by the light microscopy. Liver Quant. Aspects Struct. Funct. Proc. Int. Gstaad Symp., 1st 1972, 69-75.
- 66 - Vogel, G., Trost, W., Halbach, G. (1974). Etude de l'action protectrice de la silymarine viv-à-vis de l'intoxication par la phalloïdine chez la souris. Agressologie, 15: 263-270.
- 67 - Weiss, E., Sterz, I., Frimmer, M., Kroker, R. (1973). Electron microscopy of isolated rat hepatocytes before and after treatment with phalloidin. Beith. Pathol., 150: 345-356.
- 68 - Wieland, Th. (1975a). Poisonous principles of mushrooms of the genus *Amanita*. Science, 159: 946-952.
- 69 - Wieland, Th. (1976). Phallotoxins and microfilaments. Colloquium-Mosbach 1975, Molecular Basis of Motility, 26: 203-214.
- 70 - Wieland, Th. (1977). Interaction of phallotoxins with actin. Advances in enzymes regulations, 15: 285-300.
- 71 - Wieland, Th., De Vries, J.X., Schäfer, A., Faulstich, H. (1975b). Spectroscopic evidence for the interaction of phalloidin with actin. FEBS Lett., 54: 73-75.
- 72 - Wieland, Th., Faulstich, H. (1978). Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. Critical Rev. Biochem., 5: 185-260.

- 73 - Wieland, Th., Govindan, V.M. (1974). Phallotoxins bind to actins. FEBS Lett., 46: 351-353.
- 74 - Wieland, Th., Wieland, Ot. (1972). The toxic peptides of *Amanita* species. Microbial toxins, chap. 10: 249-280.
- 75 - Yocum, R.R., Simon, D.M. (1977). Amatoxins and phallotoxins in *Amanita* species of the northeastern United States. Lloydia, 40: 178-190.
- 76 - Zuretti, M.F., Baccino, F.M. (1976). Studies on the hepatotoxicity of *Amanita phalloides* in the rat. Exp. Mol. Pathol., 24: 176-192.
- 77 - Zuretti, M.F., Pernigotti, L., Torrielli, M.V., Baccino, F.M. (1975). Effects of sympatholytic agents on *Amanita phalloides* toxicity in the rat. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 10: 455-464.